

**Die Rolle von Bone Morphogenetic Protein Typ I Rezeptoren  
in der Bone Morphogenetic Protein-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung  
der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T½**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)

genehmigte  
Dissertation

von  
Christian Kaps  
aus Gifhorn

1. Referent: PD Dr. G. Gross

2. Referent: Prof. Dr. J. Wehland

eingereicht am: 28.02.2000

mündliche Prüfung (Disputation) am: 07.07.2000

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung des Vorsitzenden der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Betreuer der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen und Tagungsbeiträge**

C. Kaps, J. Lauber, W. Ju, S. Czichos, G. Gross

The recombinant expression of bone morphogenetic protein type IA receptor (Alk3) in mesenchymal progenitors C3H10T1/2 is sufficient for osteo-/chondrogenic development  
Biochem Soc Trans 26, 27-32, 1998

C. Kaps, T. Häupl, M. Sittinger, O. Schultz, U. Ungethüm, G.R. Burmester, G. Gross

Cartilage markers in de- and redifferentiating chondrocyte cultures  
18<sup>th</sup> European Workshop for Rheumatology Research; Athen, Greece, 1998, Poster

C. Kaps, T. Häupl, M. Sittinger, O. Schultz, U. Ungethüm, G.R. Burmester, G. Gross

Tissue engineering of cartilage: influence of culturing techniques on chondrocyte de- and redifferentiation  
National Meeting of American College of Rheumatology; San Diego, USA, 1998, Poster  
Arthritis&Rheumatism 41, p. 42, 1998

C. Kaps, T. Häupl, D.H. Lao, M. Sittinger, G. Gross

BMP-receptor-IA (BMPR-IA, Alk3) and not the BMP-receptor-IB (BMPR-IB, Alk6) mediates the BMP-2 dependent chondro-/osteogenic differentiation potential in mesenchymal progenitors C3H10T1/2  
11<sup>th</sup> International Workshop on Calcified Tissues; Eilat, Israel, 1999, Poster/Vortrag

C. Kaps, T. Rathert, C. Bramlage, A. Haisch, U. Ungethüm, M. Sittinger, G.R. Burmester, G. Gross, T. Häupl

Bone Morphogenetic Proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion  
2<sup>nd</sup> BioValley Tissue Engineering Symposium; Freiburg, Germany, 1999, Poster/Vortrag  
Cells Tissues Organs 166, p. 42, 2000

C. Kaps, T. Rathert, C. Bramlage, A. Haisch, U. Ungethüm, M. Sittinger, G.R. Burmester, G. Gross, T. Häupl

Bone Morphogenetic Proteins promote cartilage differentiation and protect engineered artificial cartilage from fibroblast invasion  
Davos Tissue Engineering Workshop; Davos, Switzerland, 2000, Vortrag

### **Auszeichnungen**

Avrion-Mitchison-Preis für Rheumaforschung 1999

C. Bramlage, C. Kaps, U. Ungethüm, T. Häupl

Bone Morphogenetic Proteins in tissue homeostasis of adult joints:  
Deregulation in inflammatory and degenerative joint diseases

## **Vorwort**

Diese Dissertation entstand im Rahmen eines Kooperationsprojektes während meiner Tätigkeit in der Arbeitsgruppe „Growth Factors and Receptors“ der Abteilung Genetik der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH in Braunschweig als auch in der Arbeitsgruppe „Experimental Rheumatology and Tissue Engineering“ der Abteilung Rheumatologie der Charité in Berlin.

Hier möchte ich allen danken, die durch ihre Unterstützung und Interesse zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dank gilt hierbei besonders Dietmar Bächner, Renate Bonewald, Petra Buhr, Stefan Czichos, Johanna Golla, Andrea Hoffmann, Zoltán Konthur, Jörg Lauber, Hubert Mayer, Thomas Rudolph, Olaf Schultz, Bruno Stuhlmüller, Ute Ungethüm und nicht zu vergessen die übrigen Mitarbeiter des 3. Stocks im D-Gebäude, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Freundschaft für eine angenehme Arbeitsatmosphäre sorgten.

Dank geht auch nach Jerusalem an Dan Gazit und seine Mitarbeiter für die wunderbaren Transplantationen und in vivo Analysen unserer Zellen.

Danken möchte ich auch Prof Jürgen Wehland und Prof Norbert Käufer für die Übernahme des Koreferats und die damit verbundenen Mühen.

Besonderer Dank gilt vor allem auch Dr. Thomas Häupl und PD Dr. Michael Sittinger für Beistand und Freiräume, ohne die diese Arbeit sicherlich nicht hätte zustande kommen können.

Ein besonders herzlicher Dank gilt hier meinem Mentor PD Dr. Geri Gross, der mir nicht nur in fachlichen sondern vor allem durch freundschaftliche Gespräche auch aus der Ferne hilfreich zur Seite stand.

Christian Kaps

Berlin, im Februar 2000





<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 DIE TGF- $\beta$ SUPERFAMILIE.....	1
1.1.1 Strukturelle Charakteristika von Faktoren der TGF- $\beta$ Superfamilie .....	1
1.1.2 Mitglieder und Subfamilien der TGF- $\beta$ Superfamilie .....	2
1.1.3 Bone Morphogenetic Proteins .....	4
1.2 REZEPTOREN UND REZEPTORKOMPLEXE DER TGF- $\beta$ SUPERFAMILIE .....	4
1.2.1 Rezeptoren der TGF- $\beta$ Rezeptorkomplexe.....	4
1.2.2 Ausbildung der BMP Rezeptorkomplexe.....	7
1.3 ZYTOSOLISCHE MEDIATOREN DER TGF- $\beta$ SIGNALKASKADE.....	8
1.3.1 Mitglieder der Smad-Familie.....	8
1.3.2 Aufbau, Aktivierung und Funktion von Smads .....	9
1.3.3 Modell der Smad-abhängigen TGF- $\beta$ Signalkaskade.....	10
1.4 IN VITRO MODELLE DER OSTEOLASTENDIFFERENZIERUNG.....	11
1.5 AUFGABENSTELLUNG .....	13
 <b>2 ERGEBNISSE.....</b>	 <b>15</b>
2.1 VEKTORKONSTRUKTION UND MOLEKULARE KLONIERUNG .....	15
2.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors pBIG-2 (hBMP-2-IRES-Gal/neo).....	15
2.1.2 Konstruktion des Kontrollvektors pKIG (Kontrolle-IRES-Gal/neo) .....	16
2.1.3 Subklonierung der BMPR-IA und BMPR-IB Rezeptorvarianten .....	16
2.1.4 Mutagenese der konstitutiv-aktiven BMPR-IB Rezeptorvariante.....	17
2.1.5 Molekulare Klonierung der humanen GDF-5 cDNA.....	18
2.1.6 Eingesetzte Vektoren .....	18
2.2 STABILE TRANSFEKTION DER MESENCHYMALEN VORLÄUFERZELLINIE C3H10T $\frac{1}{2}$ .....	20
2.2.1 Transfektion zur Expression des humanen Bone Morphogenetic Protein-2.....	20
2.2.2 Transfektion zur Expression der Bone Morphogenetic Protein Typ I Rezeptoren.....	24
2.2.3 Transfektion zur Expression des humanen Growth and Differentiation Factor-5.....	26
2.2.4 Übersicht der etablierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinien .....	27
2.3 BETRACHTUNGEN ZU DEN VERFAHREN DER cDNA-SYNTHESE UND RT-PCR.....	28
2.4 DIFFERENZIERUNGSSTUDIEN .....	30
2.4.1 Komponenten der Bone Morphogenetic Protein - Signalkaskade .....	30
2.4.2 BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.....	31
2.4.2.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	31
2.4.2.2 Morphologie und histologische Färbungen zur BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.....	36
2.4.3 Einfluß von BMP Typ I Rezeptoren auf die BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung ..	39
2.4.3.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMP-2 und BMPR-I exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	39
2.4.3.2 Histologische Färbungen zur BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung in BMP-2/BMPR-I exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	41
2.4.3.3 Rezeptor-Liganden Bindungsstudien.....	43
2.4.4 Einfluß von dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren auf die BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.....	44
2.4.4.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMP-2 und BMPR-I-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	45
2.4.4.2 Histologische Färbungen zur BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung in BMP-2/BMPR-I-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.....	47
2.4.4.3 Rezeptor-Liganden Bindungsstudien.....	49
2.4.4.4 Nachweis der rekombinanten Expression dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren mittels fusionierter Flag-Epitope .....	50
2.4.4.5 Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen <i>in vivo</i> .....	53
2.4.5 Einfluß von BMP Typ IA Rezeptoren auf die chondro-/osteogene Differenzierung von parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	54
2.4.5.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMPR-IA und BMPR-IA-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	54
2.4.5.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung BMP Typ IA Rezeptorvarianten exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.....	57

2.4.6 Einfluß von BMP Typ IB Rezeptoren auf die chondro-/osteogene Differenzierung von parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	59
2.4.6.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMPR-IB und BMPR-IB-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	59
2.4.6.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung BMP Typ IB Rezeptorvarianten exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	62
2.4.7 GDF-5 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	64
2.4.7.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in der GDF-5 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	64
2.4.7.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung GDF-5 exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	67
2.4.8 Einfluß von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren auf die chondro-/osteogene Differenzierung von parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	70
2.4.8.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in konstitutiv-aktive BMPR-IB exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	70
2.4.8.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	72
<b>3 DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
3.1 BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-2 ABHÄNGIGE DIFFERENZIERUNG DER MESENCHYMALEN VORLÄUFERZELLINIE C3H10T $\frac{1}{2}$ .....	74
3.2 BMP TYP I REZEPTOREN IN DER BMP-2 ABHÄNGIGEN DIFFERENZIERUNG VON C3H10T $\frac{1}{2}$ -ZELLEN .....	76
3.3 GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR-5 ABHÄNGIGE DIFFERENZIERUNG DER MESENCHYMALEN VORLÄUFERZELLINIE C3H10T $\frac{1}{2}$ .....	85
3.4 DIE ROLLE VON PEX IN DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG MESENCHYMALER ZELLEN .....	87
3.5 MODELL DER BMP2-VERMITTELTEN CHONDRO-/OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG IN MESENCHYMALEN VORLÄUFERZELLEN C3H10T $\frac{1}{2}$ .....	90
<b>4 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>91</b>
<b>5 METHODEN .....</b>	<b>93</b>
5.1 ALLGEMEINE METHODEN ZUR SUBKLONIERUNG VON DNA.....	93
5.1.1 Agarosegelelektrophorese von DNA .....	93
5.1.2 Restriktion von DNA .....	93
5.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	93
5.1.3.1 Elution von DNA-Fragmenten aus LMP-Agarose nach Jet-Sorb <sub>Genomed</sub> .....	93
5.1.3.2 Elution von DNA-Fragmenten aus LMP-Agarose nach Wizard PCR Preps DNA Purification System.....	94
5.1.4 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden .....	95
5.1.4.1 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Polymerase .....	95
5.1.4.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase.....	95
5.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	95
5.1.6 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden.....	95
5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten.....	96
5.2 ALLGEMEINE METHODEN ZUM ARBEITEN MIT DNA.....	97
5.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration.....	97
5.2.2 Natrium-/Ammoniumsalz-Alkohol Fällung von DNA .....	97
5.2.3 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung von Proteinen.....	97
5.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	98
5.2.5 cDNA-Klonierung und zielgerichtete Mutagenese .....	98
5.2.5.1 cDNA-Klonierung.....	98
5.2.5.2 Zielgerichtete Mutagenese.....	99
5.2.6 Klonierung von PCR-Produkten.....	100
5.2.7 Sequenzierung von DNA .....	102
5.2.7.1 Gelpräparation .....	102
5.2.7.1 Cycle-Sequenzierreaktion.....	102
5.2.8 Fluorescein-Markierung von Oligonukleotiden.....	103

5.3 ARBEITEN MIT ESCHERICHIA COLI .....	105
5.3.1 E. coli Stämme .....	105
5.3.2 Kulturmedien und Lösungen .....	105
5.3.3 Herstellung kompetenter Zellen für Transformation mittels Elektroporation.....	106
5.3.4 Transformation kompetenter Bakterien .....	106
5.3.4.1 Transformation kompetenter Bakterien mittels Elektroporation.....	106
5.3.4.2 Hitzeschocktransformation kompetenter Bakterien.....	106
5.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli .....	107
5.3.5.1 Präparation von Plasmiden im analytischen Maßstab.....	107
5.3.5.2 Präparation von Plasmiden im quantitativen Maßstab .....	107
5.4 ARBEITEN MIT EUKARYOTISCHEN ZELLEN .....	108
5.4.1 Zelllinie.....	108
5.4.2 Kulturmedien und Lösungen .....	108
5.4.3 Kulturbedingungen .....	109
5.4.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen .....	109
5.4.4.1 Auftauen von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen .....	109
5.4.4.2 Einfrieren von Zellen .....	109
5.4.5 Passagieren von Zellen .....	109
5.4.6 Stabile Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen .....	110
5.4.6.1 Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation .....	110
5.4.6.2 Transfektion mittels Liposom-DNA-Komplexe .....	110
5.4.7 Histologische Färbetechniken .....	111
5.4.7.1 Fixierung der zu färbenden Zellen .....	111
5.4.7.2 Alcian Blau Färbung (Chondrozytenfärbung).....	111
5.4.7.3 Oil Red O Färbung (Adipozytenfärbung).....	112
5.4.7.4 Alkalische Phosphatase Färbung (Osteoblasten- und Chondrozytenfärbung).....	112
5.4.7.5 von Kossa Färbung (Nachweis der Mineralisierung).....	112
5.4.7.6 Kernfärbung mit Hämatoxylin .....	112
5.4.7.7 X-Gal Färbung zum Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase .....	113
5.4.7.8 Nachweis zur Expression von GFP .....	113
5.4.8 Isolierung primärer Chondrozyten aus Knorpelgeweben .....	113
5.5 ARBEITEN MIT NUKLEINSÄUREN .....	113
5.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen .....	114
5.5.2 Isolierung von mRNA aus eukaryotischen Zellen .....	114
5.5.3 cDNA-Synthese.....	115
5.6 REZEPTOR-BINDUNGSSTUDIEN MITTELS REKOMBINANTER PROTEINE .....	115
5.6.1 Iodierung rekombinanter Proteine .....	115
5.6.2 Rezeptor-Bindungsstudie .....	116
5.7 IMMUNOLOGISCHER NACHWEIS REKOMBINANTER EXPRESSION IN EUKARYOTISCHEN ZELLEN .....	116
5.7.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus eukaryotischen Zellen .....	116
5.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Coomassie Brilliant Blue.....	117
5.7.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	117
5.7.4 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue.....	117
5.7.5 Western-Blotting .....	118
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>119</b>
<b>7 ANHANG.....</b>	<b>130</b>
7.1 OLIGONUKLEOTIDE.....	130
7.1.1 Oligonukleotide zur Klonierung und Subklonierung .....	130
7.1.2 Oligonukleotide zum Nachweis rekombinanter Expression.....	130
7.1.3 Oligonukleotide zum Nachweis spezifischer Markergene .....	131
7.2 SEQUENZEN.....	132
7.2.1 cDNA-Sequenz des humanen BMPR-IA .....	132
7.2.2 cDNA-Sequenz des humanen BMPR-IADN.....	132
7.2.3 cDNA-Sequenz des humanen BMPR-IA-DN-flg.....	133
7.2.4 cDNA-Sequenz des murinen BMPR-IB.....	133
7.2.5 cDNA-Sequenz des murinen BMPR-IBDN .....	133
7.2.6 cDNA-Sequenz des murinen BMPR-IB-DN-flg .....	133
7.2.7 cDNA-Sequenz des humanen GDF-5 .....	133
7.3 PLASMIDE UND CDNAS.....	134

7.4 GERÄTE UND MATERIALIEN.....	134
7.4.1 Geräte.....	134
7.4.2 Materialien und Zellkulturmedien .....	134
7.4.3 Enzyme und Chemikalien .....	134
7.5 COMPUTERPROGRAMME/DATENBANKEN .....	135
7.6 ABKÜRZUNGEN.....	135

## 1 Einleitung

### 1.1 Die TGF- $\beta$ Superfamilie

Die *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie stellt eine große Familie konservierter Polypeptide dar, die als sezernierte Faktoren eine wichtige Rolle in Wachstums- und Differenzierungsprozessen unterschiedlichster Zelltypen aufweisen. Neben der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Matrixsynthese und Apoptose zeigen viele der Mitglieder wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung, wie Musterbildung und Spezifikation von Geweben. Im adulten Organismus konnte die Beteiligung an Reparaturmechanismen von Geweben und an der Modulation und Überwachung des Immunsystems aufgezeigt werden [Heldin, 1997]. Die Bezeichnung der TGF- $\beta$  Superfamilie läßt sich auf das erste isolierte Mitglied dieser Familie zurückführen, den *Transforming Growth Factor- $\beta$ 1* [Massague, 1990], welcher die Proliferation verschiedener Zelllinien inhibiert. Die dem Namen abzuleitenden Transformationseigenschaften von TGF- $\beta$ 1 basieren eher auf sekundären Effekten hinsichtlich der Induktion von Wachstumsfaktoren und Matrixbildung [Moses, 1990].

Zur Zeit sind mindestens 43 Proteine aus Invertebraten und Vertebraten von *Drosophila* bis hin zu Säugern isoliert worden, die der TGF- $\beta$  Superfamilie zuzuordnen sind; hierzu zählen Transforming Growth Factors (TGFs), Activine, Inhibine, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Müllerian Inhibiting Substance (MIS), Nodal, Glial-derived Neurotrophic Factor (GDNF) und *lefty* [Roberts and Sporn, 1990; Zhou, 1993; Lin, 1993; Meno, 1996].

#### 1.1.1 Strukturelle Charakteristika von Faktoren der TGF- $\beta$ Superfamilie

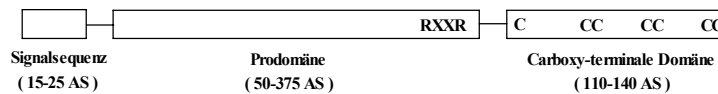
Die Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie werden als große Vorläufermoleküle mit einer aminoterminalen Signalsequenz (15-25 AS) und einer sogenannten Prodomäne variierender Größe (50-375 AS) synthetisiert (Abbildung 1.1A), wobei die Signalsequenz für den sekretorischen Prozeß und die Prodomäne für Faltung, Dimerisierung und Regulation der Aktivität verantwortlich zeichnet. Das reife Signalmolekül ist auf die kleine carboxy-terminale Domäne zurückzuführen (110-140 AS).

Die Prodomäne ist bei den verschiedenen Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Superfamilie eher schwach konserviert, während die carboxy-terminale Domäne weitaus stärker konserviert ist. Im Zuge der Proteinreifung wird das Vorläufermolekül im allgemeinen an einer bestimmten Sequenz geschnitten (RXXR), so daß aus dem carboxy-terminalen Bereich das reife Protein entsteht.

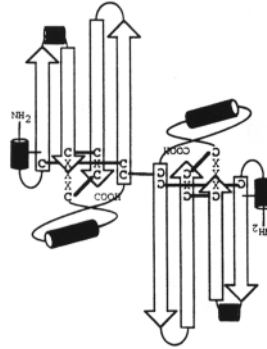
Das aktive Signalmolekül (Abbildung 1.1B) setzt sich aus Homo- oder Heterodimeren zusammen. Als charakteristisches Merkmal der TGF- $\beta$ -carboxy-terminalen Domäne sind sieben bis neun konservierte Cysteinreste zu nennen, von denen sechs als Gruppen vorliegen und über Disulfidbrücken sogenannte Cysteinknoten bilden. Das siebte Cystein ist für die Ausbildung einer weiteren Disulfidbrücke zwischen zwei TGF- $\beta$ -Monomeren verantwortlich [Hogan, 1994; Kingsley, 1994a, Hoodless, 1998].

Ein Großteil der Unterschiede innerhalb der TGF- $\beta$ -Superfamilie beruht auf der differierenden Ausprägung von Schleifen und  $\alpha$ -Helices, welche die  $\beta$ -Faltblattstrukturen innerhalb der Moleküle verbinden, welches anhand von Kristallstrukturanalysen für einige Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie, wie beispielsweise TGF- $\beta$ 2, BMP-7 oder BMP-2, gezeigt werden konnte [Daopin, 1992; Griffith, 1996; Scheufler, 1999].

A



B



**Abbildung 1.1:** Struktur der Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie

- A) Schematischer Aufbau des TGF- $\beta$  Vorläufermoleküls
- B) Struktur des reifen TGF- $\beta$  Signalmoleküls

### 1.1.2 Mitglieder und Subfamilien der TGF- $\beta$ Superfamilie

Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie werden aufgrund von Sequenzhomologien der reifen carboxy-terminalen Domäne in fünf Untergruppen unterteilt [Derynck, 1997; Wozney, 1998]; es werden die TGF- $\beta$ -, die Aktivin-, die dpp-, die 60A- und die GDF-Subfamilie unterschieden.

Der TGF- $\beta$ -Subfamilie werden die Faktoren TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2, - $\beta$ 3 und - $\beta$ 5 zugeordnet, die sowohl inhibitorische als auch stimulierende Effekte auf die Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelllinien von epithelalem oder mesenchymalem Charakter zeigen [Burt, 1992; Kingsley, 1994a].

Den Aktivinen werden die Faktoren Inhibin- $\beta$ A und - $\beta$ B zugeschrieben. Diese Faktoren bilden Homo- oder Heterodimere aus Inhibin- $\beta$ A/Inhibin- $\beta$ B-Untereinheiten und können zudem mit Inhibin- $\alpha$  dimerisieren. Heterodimere aus Inhibin- $\beta$ - und Inhibin- $\alpha$ -Untereinheiten werden als Inhibine bezeichnet. Aktivine und Inhibine zeigen oftmals gegenläufige Wirkungen und spiegeln wider, daß Dimerisierung verschiedener TGF- $\beta$ -Mitglieder zu vielfältigen Aktivitäten führen kann, die durchaus antagonistische Effekte aufweisen [Ying, 1989].

Die dpp- und 60A-Subfamilie weisen größere Homologien zueinander als zu der TGF- $\beta$ - oder Aktivin-Subfamilie auf, so daß diese Subfamilien oft zu der DVR-Gruppe (*dpp and Vgl related*) oder zur BMP-Superfamilie zusammengefaßt werden [Lyons, 1989; Hogan, 1996]. Der dpp-Subfamilie werden das *Drosophila*-Gen *dpp* (*decapentaplegic*), BMP-2 und BMP-4 zugeordnet. Dem Gen *dpp* kommt eine entscheidende Rolle während der dorso-ventralen Musterbildung des embryonalen Blastoderms der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu,

wobei dpp als lokales Morphogen wirkt [Ferguson, 1992]. Die Inaktivierung von dpp in diesem Entwicklungsstadium führt zur Erweiterung dorsaler Strukturen, während die Erhöhung der dpp-Konzentration zur Expansion ventraler Elemente führt [Wharton, 1993].

In Säugern wurden BMP-2 und BMP-4 aufgrund ihrer Eigenschaften isoliert, bei Implantation unter die Haut oder in Muskelgeweben ektopische Knochen- respektive Knorpelbildung zu induzieren [Wozney, 1988]. Interessanterweise lassen sich zwischen dpp und BMP-2/BMP-4 nicht nur Homologien in Bezug auf die Sequenz feststellen, vielmehr konnte auch eine funktionelle Homologie beobachtet werden. So können Sequenzen von humanem BMP-4 Defekte ausgleichen, die auf dpp-Mutationen beruhen und zu einer Fehlentwicklung der dorso-ventralen Achsenbildung führen [Padgett, 1993]. Demgegenüber zeigt dpp in Säugern die Fähigkeit Knochen- und Knorpelbildung zu induzieren [Sampath, 1993].

Zur 60A-Subfamilie werden das *Drosophila*-Gen 60A [Wharton, 1991] und die Säugerhomologa BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8a (OP-2) und BMP-8b (OP-3) gezählt, die osteoinduktive Eigenschaften aufweisen und aus knocheninduzierendem Material isoliert wurden [Kingsley, 1994a].

Der GDF-Subfamilie (*Growth and Differentiation Factor*) werden unter anderem die sezernierten Faktoren GDF-5, GDF-6 (BMP-13), GDF-7 (BMP-12), GDF-8 (*myostatin*) und GDF-9 zugeordnet [Kawabata, 1998]. Die Mitglieder der GDF-Subfamilie zeigen ähnlich den übrigen Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie eine Beteiligung an vielfältigen Regulations- und Differenzierungsprozessen während der Embryonalentwicklung. So wurde GDF-5 oder auch CDMP-1 ursprünglich als ein „*Cartilage-derived Morphogenetic Protein*“ aus Knorpelgewebe isoliert und induziert *in vivo* ektopisch Knochen und Knorpel oder Sehnen und Ligamente [Chang, 1994; Wolfman, 1997]. Mutationen im GDF-5 Gen (*brachyodism*) führen in der Maus zur Verkürzung der Gliedmaßen und zu einer Reduktion der Zehenknochen [Storm, 1994].

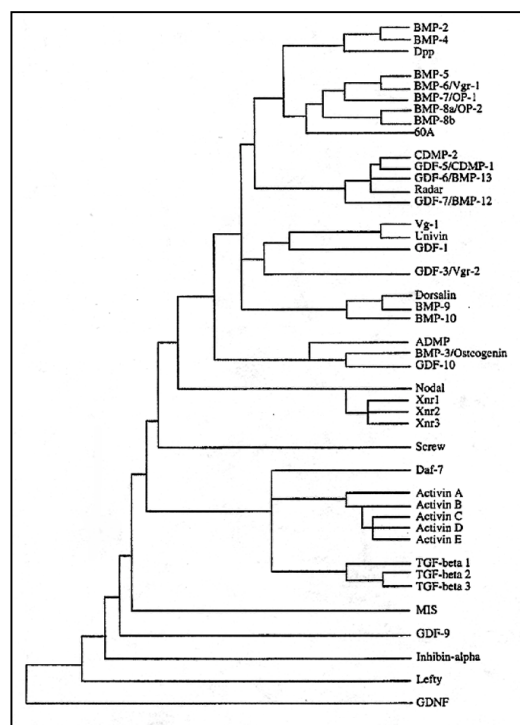


Abbildung 1.2: Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie [Derynck & Feng, 1997]



Die Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Abbildung 1.2) zeigen sowohl in Invertebraten als auch in Vertebraten vielfältige entwicklungsbiologisch relevante Effekte, wobei in der hier vorliegenden Arbeit die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) und deren Signalkaskade in der Knochen- und Knorpelentwicklung im Vordergrund stehen.

### 1.1.3 Bone Morphogenetic Proteins

Die osteoinduktiven *Bone Morphogenetic Proteins* wurden entdeckt, als Proteinextrakte aus demineralisierter Knochenmatrix subkutan oder intramuskulär Ratten appliziert wurden. Es zeigte sich, daß die Proteinextrakte ektopisch Knochen- und Knorpelbildung induzierten. Die induzierenden Faktoren wurden *Bone Morphogenetic Proteins* genannt [Urist, 1965/1983].

Mittlerweile konnten mit Hilfe abgeleiteter Gensonden die humanen cDNAs von BMP-1 bis BMP-8 kloniert werden [Wozney, 1988; Celeste, 1990 und Ozkaynak, 1992], wobei außer BMP-1 alle Proteine der TGF- $\beta$  Superfamilie zugeordnet werden konnten.

Weitere Hinweise, daß BMPs mit der Knochen- und Knorpelentwicklung korrelieren, ergaben sich aus Mutationen im BMP-5 Gen (*short ear*), welche in der Maus zu Veränderungen der Größe, Form und Anzahl diverser Skelettelemente sowie zu einer Verkleinerung der Ohren führen [King, 1994; Kingsley, 1994b].

Neben diesen osteoinduktiven Eigenschaften konnte eine Beteiligung von BMP-vermittelten Signalen in der Entwicklung verschiedenster Organe aufgezeigt werden. So wird beispielsweise unter anderem BMP-7 in der embryonalen Niere exprimiert; Null-Mutationen von BMP-7 sind letal und weisen empfindliche Störungen der Nephrogenese auf [Dudley, 1995; Luo, 1995].

Weitere Null-Mutationen von BMPs und *in situ*-Hybridisierungen deuten auf eine Beteiligung an der Zahn-, Lungen-, Darm- und Haarentwicklung hin [Hogan, 1996]. Während der Organogenese käme den BMPs hierbei die Rolle eines Vermittlers der induktiven Interaktionen zwischen mesenchymalen und epithelialen Zellen zu. So konnte gezeigt werden, daß BMP-4, welches während der Zahnentwicklung in epithelialen Geweben exprimiert wird, die Expression verschiedener Gene im angrenzenden Mesenchym induziert [Vainio, 1993].

## 1.2 Rezeptoren und Rezeptorkomplexe der TGF- $\beta$ Superfamilie

Den vielfältigen Eigenschaften und Wirkungen der *Bone Morphogenetic Proteins* liegt eine filigrane Signaltransduktionskaskade zugrunde, welche sowohl für TGF- $\beta$ - als auch BMP-Rezeptoren anschaulich charakterisiert wurde.

### 1.2.1 Rezeptoren der TGF- $\beta$ Rezeptorkomplexe

Die isolierten Rezeptoren für Signalmoleküle der TGF- $\beta$  Superfamilie gehören zu einer Familie von Transmembranrezeptoren, die zytosolisch eine Serin-/Threonin-Kinasedomäne aufweisen und deren Aktivität durch Bindung der Liganden auf ihrer extrazellulären Seite stimuliert wird [Massagué, 1992]. Es werden Typ I und Typ II Rezeptoren unterschieden (Abbildung 1.3), die für eine korrekte Signalweiterleitung nötig sind und dabei einen heterooligomeren Komplex ausbilden. Nach Aktivierung des Rezeptorkomplexes erfolgt die Phosphorylierung von zytosolischen Komponenten der Signalkaskade (Smads), welche letztendlich in den Zellkern gelangen, um dort die Genexpression spezifischer Gene zu aktivieren.

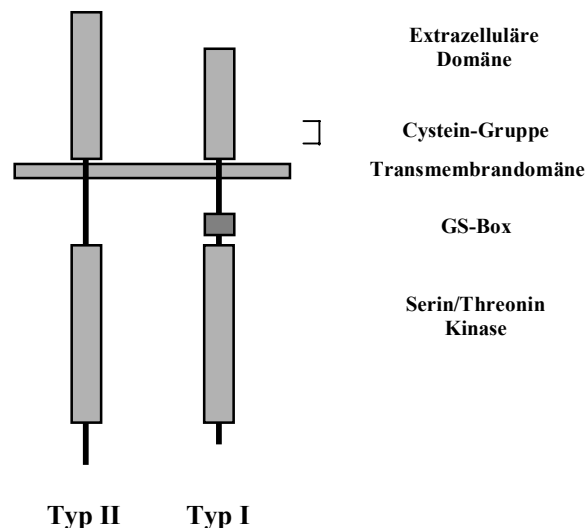


Abbildung 1.3: Schematischer Aufbau der TGF- $\beta$  Typ II und Typ I Rezeptoren

Typ II Rezeptoren der TGF- $\beta$  Superfamilie sind membranständige Serin/Threonin-Kinasen mit einer einzelnen Transmembrandomäne, einer extrazellulären Domäne zur Ligandenbindung und einer intrazellulären Domäne mit Kinaseaktivität [Lin, 1992]. Die extrazellulären Domänen der Typ II Rezeptoren sind wenig konserviert, zeigen aber eine charakteristische Gruppe von Cysteinresten nahe der Transmembrandomäne („cysteine-cluster“). Weitere Cysteinreste innerhalb der extrazellulären Domäne weisen auf mehrere Disulfidbrücken hin, deren Ausbildung für die Bindung von Liganden notwendig scheint.

In Vertebraten und Invertebraten konnten für die einzelnen Mitglieder der TGF- $\beta$  Superfamilie verschiedene Typ II Rezeptoren kloniert werden (Tabelle 1.1). So konnte für TGF- $\beta$  und BMP-2/-4 jeweils ein Typ II Rezeptor (T $\beta$ R-II/BMPR-II) ausgemacht werden [Liu, 1995; Rosenzweig, 1995], wohingegen Aktivine zwei Typ II Rezeptoren (ActR-II/ActR-IIb) aufweisen [Mathews, 1991; Attisano, 1992]. Homologe Typ II Rezeptoren wurden ebenfalls in *Drosophila* (Punt), *Xenopus* (XBMPR-II) und *C. elegans* (Daf-4) gefunden [Letsou, 1995; Frisch, 1998; Estevez, 1993].

Ähnlich den Typ II Rezeptoren weisen Typ I Rezeptoren eine intrazelluläre Serin/Threonin-Kinasedomäne, eine Transmembrandomäne und eine extrazelluläre Domäne mit konservierter Cystein-Gruppe auf. Im Gegensatz zu Typ II Rezeptoren befindet sich intrazellulär ein kurzer Bereich, die GS-Box (SGSGSGLP), welche als strukturelles Merkmal innerhalb der Gruppe von Typ I Rezeptoren konserviert ist (Abbildung 1.3).

Beginnend mit der Klonierung der Activin Typ I Rezeptoren konnten bisher für Säuger mindestens 7 homologe Typ I Rezeptoren (ALKs, *activin-receptor like kinase*) aufgezeigt werden (Tabelle 1.1). Für TGF- $\beta$  und Activin konnten die Rezeptoren T $\beta$ R-I (ALK-5), TSR-1 (ALK-1), ActR-I (ALK-2) und ActR-IB (ALK-4) kloniert werden [Attisano, 1993; Ebner, 1993; Franzén, 1993; ten Dijke, 1994a]. Für BMP-2/-4, BMP-7 und GDF-5 konnten neben ActR-I die beiden BMP Typ I Rezeptoren BMPR-IA (ALK-3) und BMPR-IB (ALK-6) bestimmt werden [ten Dijke, 1993/1994b; Koenig, 1994].

Homologe Typ I Rezeptoren wurden ebenfalls in *Drosophila* (AtRI, Tkv, Sax), Zebrafisch (ALK-8) und *C. elegans* (Daf-1) gefunden [Raftery, 1999; Yelick, 1998; Georgi, 1990].

Tabelle 1.1: Typ II und Typ I Rezeptoren der TGF- $\beta$  Superfamilie (nach Derynck, 1997)

Type II receptors		Ligands
<b>T<math>\beta</math>RII</b>	Type II TGF- $\beta$ receptor	TGF- $\beta$
<b>ActRII</b>	Type II activin receptor	activins, BMP-7/OP-1, GDF-5
<b>ActRIIB</b>	Type II activin receptor	activins, BMP-7/OP-1, GDF-5, BMP-2
<b>BMPRII, BRK3</b>	Type II BMP receptor	BMP-2/4, BMP-7/OP-1
<b>AMHR, C14</b>	Type II MIS receptor	MIS
<b>Punt, AtRII</b>	Type II Dpp receptor	Dpp
<b>Daf-4</b>		unknown
Type I receptors		
<b>T<math>\beta</math>RI, ALK-5, R4</b>		TGF- $\beta$
<b>ActRI, ALK-2, Tsk7L, R1, SKR1</b>		activins, TGF- $\beta$ , BMP-2/4, BMP-7/OP-1
<b>ActRIIB, ALK-4, R2</b>		activins
<b>BMPRIA, ALK-3, BRK1, TRII</b>		BMP-2/4, BMP-7/OP-1, GDF-5?
<b>BMPRIIB, ALK-6, BRK2</b>		BMP-2/4, BMP-7/OP-1, GDF-5
<b>TSR-1, ALK-1, R3</b>		TGF- $\beta$ , activins
<b>ALK-7</b>		unknown
<b>AtRI</b>		unknown
<b>Tkv</b>		Dpp
<b>Sax</b>		Dpp
<b>Daf-1</b>		unknown

Neben den Typ I und Typ II Rezeptoren konnten weitere TGF- $\beta$  bindende Zelloberflächenproteine (Typ III/Betaglycan bis Typ IX) ausgemacht werden, die offenbar nicht als „klassische“ Rezeptoren fungieren und deren biologische Funktion weitgehend ungeklärt ist. Diese Rezeptoren mögen einerseits in membranständiger Form als Reservoir freier Liganden zur Potenzierung oder andererseits in löslicher Form als kompetitive Inhibitoren der Ligandenbindung wirken [Derynck, 1994/1997]. Als weitere Rezeptorvariante für TGF- $\beta$  gilt der kürzlich isolierte Pseudorezeptor BAMBI (*BMP and activin membrane-bound inhibitor*), welcher im extrazellulären Bereich Homologien zu Typ I Rezeptoren aufweist, aber dem die intrazelluläre Kinasedomäne fehlt. Es konnte gezeigt werden, daß BAMBI durch BMP-4 reguliert wird und BMP-4 vermittelte Signale inhibiert [Onichtchouk, 1999].

Neben den Rezeptoren der TGF- $\beta$  Superfamilie sind in der Tabelle 1.1 korrespondierende Liganden aufgeführt. Die einzelnen Rezeptoren weisen ein breites Spektrum an zu bindenden Liganden auf, wobei die Bindungsspezifität des jeweiligen Typ I Rezeptors anscheinend vom Typ II Rezeptor, mit dem er koexprimiert wird, abhängt. Andererseits kann sich die Signalgebung des Typ II Rezeptors in Abhängigkeit vom exprimierten Typ I Rezeptor ändern. Derartige Kombinationsmöglichkeiten stellen einen wichtigen Mechanismus zur Kontrolle verschiedener zellulärer Antworten dar, die von Signalmolekülen der TGF- $\beta$  Superfamilie ausgelöst werden. Da auch die Signalproteine ihrerseits verschiedene Dimerisierungen ermöglichen und zum Teil funktionelle Homologie zeigen, die wiederum Einfluß auf die Rezeptorkomplexbildung haben, ergibt sich hieraus eine ungeahnte Fülle von Möglichkeiten, mit der eine Zelle oder ein Gewebe auf bestimmte Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie reagieren kann.

### 1.2.2 Ausbildung der BMP Rezeptorkomplexe

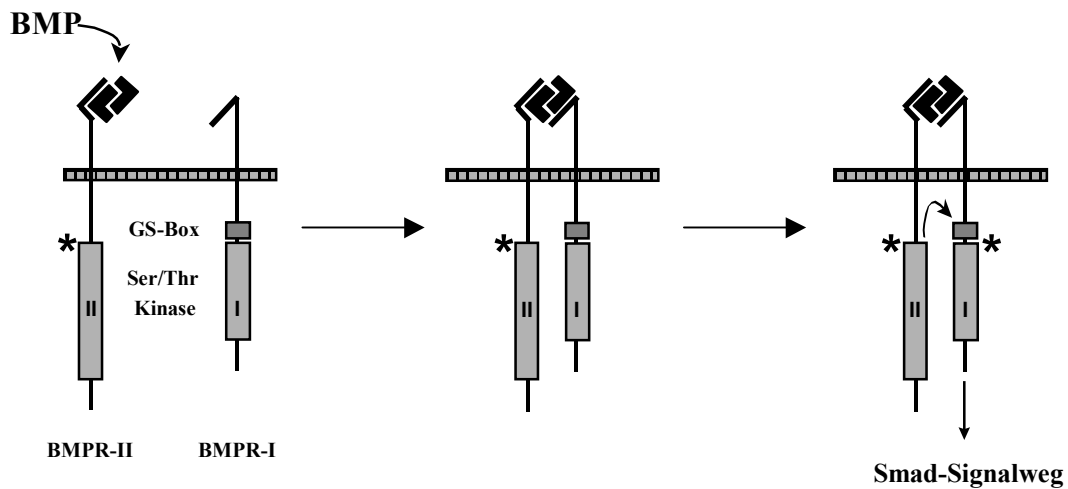


Abbildung 1.4: Ausbildung heterooligomerer BMP-abhängiger Rezeptorkomplexe

Ser/Thr	Serin/Threonin-Kinasedomäne
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR-II	BMP Typ II Rezeptor
BMPR-I	BMP Typ I Rezeptor
*	aktivierte Serin/Threonin-Kinasedomäne

Wie in Abbildung 1.4 am Beispiel der Ausbildung von BMP-abhängigen Rezeptorkomplexen dargestellt, weisen Typ II Rezeptoren eine Liganden-unabhängige konstitutive Aktivität auf, welche auf Phosphorylierung des Typ II Rezeptors durch intrazelluläre Kinasen und/oder Autophosphorylierung zurückzuführen ist [Chen, 1995]. Die Bindung der Liganden an Typ II Rezeptoren erfolgt unabhängig von Typ I Rezeptoren, welche Typ II Rezeptor-gebundene Liganden effektiv und freie Liganden mit geringerer Affinität binden [Wrana, 1994]. Dem-entgegen konnte allerdings auch eine hochaffine Bindung freier Liganden für einige Typ I Rezeptoren losgelöst von Typ II Rezeptoren gezeigt werden [Harland, 1994; Wu, 1996].

Nach Ausbildung des ternären Komplexes bestehend aus Liganden, Typ II und Typ I Rezeptoren erfolgt die Aktivierung des Typ I Rezeptors über Phosphorylierung von Serinresten innerhalb der GS-Box durch den konstitutiv-aktiven Typ II Rezeptor [Massagué, 1996]. Der Ligand fungiert somit als Adapter, welcher Typ II Rezeptoren die Rekrutierung von Typ I Rezeptoren und deren Phosphorylierung ermöglicht. Eine Signalweiterleitung durch Ausbildung von homooligomeren Rezeptorkomplexen, ob Liganden-ab- oder unabhängig scheint nicht gegeben zu sein [Vivien, 1995]; der aktive Rezeptorkomplex stellt sich als tetramere Struktur aus Typ I und Typ II Rezeptoren dar.

Die Signalweiterleitung ist auf die Phosphorylierung von zytosolischen Komponenten der Signalkaskade durch den aktivierten Typ I Rezeptor zurückzuführen [Attisano, 1996a].

### 1.3 Zytosolische Mediatoren der TGF- $\beta$ Signalkaskade

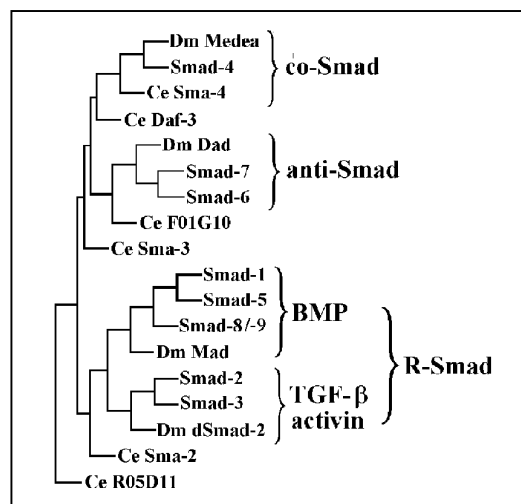
Die Suche nach zytosolischen Komponenten der TGF- $\beta$  Signalkaskade führte zur Charakterisierung einer Vielzahl von Faktoren, die durch aktivierte Rezeptorkomplexe phosphoryliert werden oder mit ausgebildeten Komplexen assoziiert sind. Neben TRIP-1 (*TGF- $\beta$ -receptor interacting protein-1*), FT- $\alpha$  (*farnesyl transferase- $\alpha$* ) und FKBP12 (*FK506/rapamycin binding protein*) sind hier als prominenteste Mediatoren TAK-1 (*TGF- $\beta$ -activated kinase-1*) und Smads zu nennen [Attisano, 1996b].

TAK-1 wurde als eine neue MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) identifiziert, welche durch TGF- $\beta$  oder BMP-4 aktiviert wird und TGF- $\beta$  responsible Promotoren reguliert [Yamaguchi, 1995]. Weitere Hinweise, daß durch TGF- $\beta$  intrazellulär eine TAK-1 abhängige Kinase-Kaskade aktiviert wird, konnte durch Charakterisierung des TAK-1 aktivierenden Faktors TAB-1 (*TAK-1 binding protein*) erbracht werden [Shibuya, 1996/1998].

Neben der Aktivierung von weiteren intrazellulären Kinasen durch TGF- $\beta$  Rezeptorkomplexe wurde in *Drosophila* während der Suche nach Maternaleffekt-Genen eine Familie von zytosolischen Proteinen gefunden, die direkt durch TGF- $\beta$  Rezeptoren phosphoryliert werden und DNA-Bindungsaktivität aufweisen. Diese Mediatoren der TGF- $\beta$  Signalkaskade aus Vertebraten (Smads), *Drosophila* (Mad) und *C. elegans* (Sma) werden als Smad-Familie bezeichnet [Whitman, 1998].

#### 1.3.1 Mitglieder der Smad-Familie

Das erste Mitglied der Smad-Familie konnte in *Drosophila* identifiziert werden. Dieses Mad-Protein (*mothers against decapentaplegic*) agiert stromabwärts („downstream“) des dpp-abhängigen heterooligomeren TGF- $\beta$  Rezeptorkomplexes und transloziert nach Phosphorylierung in den Zellkern [Raftery, 1995; Sekelsky, 1995]. Homologe Mediatoren konnten auch in Vertebraten (Human, Maus, Ratte) und *C. elegans* gefunden werden (Abbildung 1.5); zur Vereinfachung der Nomenklatur wurde die Bezeichnung Smad aus Vertebraten von den Sma-Genen aus *C. elegans* und den Mad-Genen aus *Drosophila* abgeleitet [Derynck, 1996].



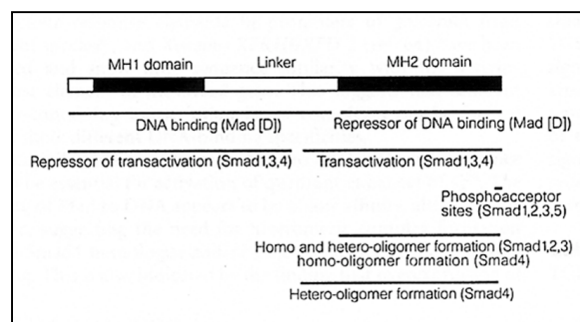
**Abbildung 1.5:** Mitglieder der Smad-Familie aus Vertebraten, *Drosophila* (Dm) und *C. elegans* (Ce) nach Raftery, 1999

Aufgrund von strukturellen und funktionellen Merkmalen werden die Mitglieder der Smad-Familie in drei Untergruppen eingeteilt (Abbildung 1.5).

Die erste Gruppe der „*receptor-regulated*“ oder R-Smads beinhaltet diejenigen Mitglieder, die als direkte Substrate der Familie von TGF- $\beta$  Rezeptoren dienen [Padgett, 1998]. Smad-4, Medea und Sma-4 werden der Gruppe der „*common mediator*“ oder co-Smads zugeordnet; co-Smads sind keine direkten Substrate der TGF- $\beta$  Rezeptoren, sind aber mit R-Smads assoziiert [Hudson, 1998]. Die Gruppe der anti-Smads beinhaltet die Faktoren Smad-6, Smad-7 und Dad, welche die Aktivierung von R-Smads inhibieren [Kretzmar, 1998].

### 1.3.2 Aufbau, Aktivierung und Funktion von Smads

Alle Mitglieder der Smad-Familie bestehen aus drei distinkten Regionen (Abbildung 1.6), wobei innerhalb der Familie die C- und N-terminalen Domänen (MH1 und MH2, *Mad-homolog domains*) die höchste Homologie aufweisen. Die zentrale Prolin-reiche Region (Linker oder P-Domäne) zeigt hingegen eine größere Divergenz und ist in ihrer Länge variabel [Heldin, 1997].



**Abbildung 1.6:** Aufbau und Funktion der Smad-Domänen nach Heldin, 1997

Im inaktiven Zustand wird der N-terminalen Domäne eine inhibitorische Funktion zugeschrieben, welche nach Aktivierung DNA-Bindungseigenschaften aufweist [Hata, 1997; Kim, 1997]. Die C-terminale Domäne oder Effektordomäne fungiert in inaktiver Form als Repressor der DNA-Bindung, führt aktiviert zur Ausbildung oligomerer Smad-Komplexe und wirkt als Transaktivator der Transkription [Meersseman, 1997].

Die Aktivierung funktioneller Smad-Komplexe ist auf die Phosphorylierung von konservierten Serinresten (SSXS) innerhalb der C-terminalen Domäne der R-Smads zurückzuführen [Maciá-Silva, 1996; Souchelnytskyi, 1997]. Die Interaktion zwischen TGF- $\beta$  Rezeptorkomplexen und inaktiviertem R-Smad mag über membranassoziierte Proteine (SARA, *Smad anchor for receptor activation*) vermittelt werden, welches für Smad-2 und Smad-3 gezeigt werden konnte [Tsukazaki, 1998]. Die Phosphorylierung der Smads führt zu einer Konformationsänderung, so daß die N- und C-terminale Domäne frei vorliegen, um nach Ausbildung eines hexaoligomeren Komplexes mit Smad-4 in den Zellkern zu translozieren [Hoodless, 1996; Lagna, 1996].

Die Funktion aktivierter Smad-Komplexe im Zellkern ist noch weitgehend ungeklärt, wobei prinzipiell zwei Modelle zur Smad-abhängigen Genaktivierung diskutiert werden. Zum einen könnten Smads als Koaktivatoren der Genexpression fungieren; Smad-2 interagiert beispielsweise mit dem Transkriptionsfaktor FAST-1 (*forkhead activin signal transducer-1*) zur Transkriptionsaktivierung des *Mix-2* Promotors. Zum anderen könnten Smads direkt die Transkription von Genen einleiten, so konnte für Mad, Smad-3 und Smad-4 eine direkte sequenz-spezifische Bindung an DNA gezeigt werden [Derynck, 1998].

### 1.3.3 Modell der Smad-abhängigen TGF- $\beta$ Signalkaskade

Die zugrunde liegenden Daten aus Vertebraten, *Drosophila* und *Xenopus* führen zu einem Arbeitsmodell der Smad-abhängigen Signaltransduktion, welches hier für *Bone Morphogenetic Proteins* und *activin-like* Signale dargestellt ist.

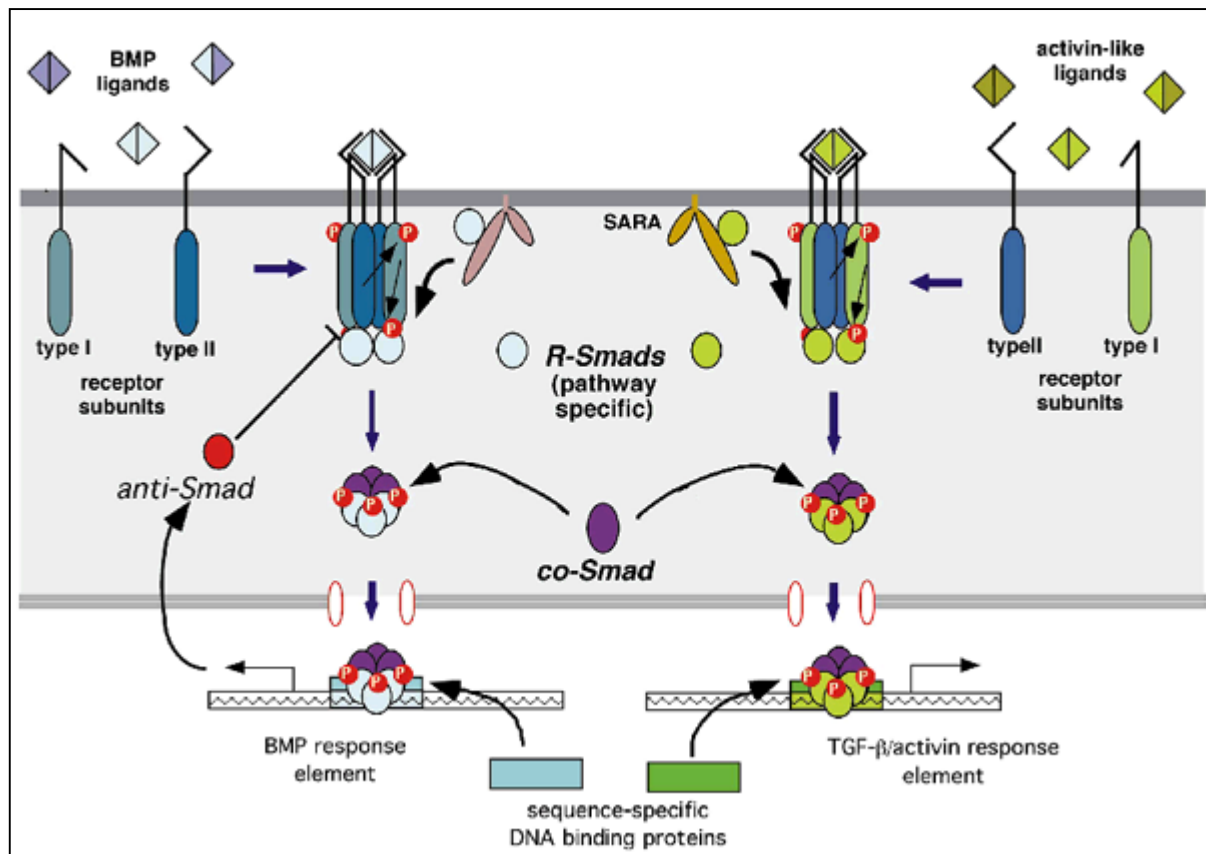


Abbildung 1.7: Modell der Smad-abhängigen TGF- $\beta$  Signalkaskade nach Raftery, 1999

#### 1.4 In vitro Modelle der Osteoblastendifferenzierung

In den zuvor aufgeführten Kapiteln konnte dargestellt werden, daß bestimmte Mitglieder der *Bone Morphogenetic Proteins* einen chondro-/osteoinduktiven Einfluß auf Zellen und Gewebe ausüben können. Eben diese Induktion von Knorpel und Knochen führte zur Entwicklung von *in vitro* Modellen zur Osteoblastenentwicklung.

Am Aufbau des Skeletts *in vivo* sind vor allem drei Zelltypen beteiligt: Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten.

Die Chondrozyten bauen das Knorpelgewebe auf, während Osteoblasten, die später zu Osteozyten differenzieren, die Knochenmatrix ablagern. Den Osteoklasten bleibt es vorbehalten den Knochen zu resorbieren. Während Chondrozyten und Osteoblasten mesenchymalen Ursprungs sind, werden Osteoklasten dem hämatopoetischen System zugeordnet.

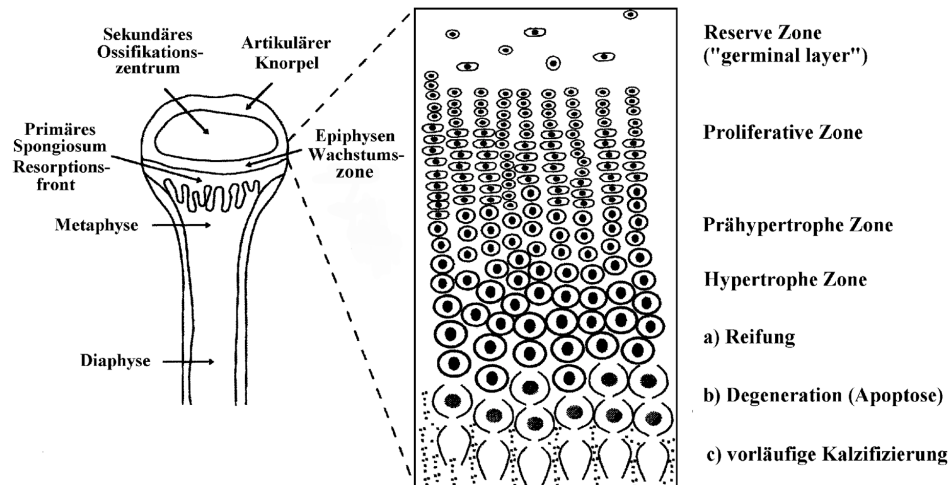
Die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten muß während der Entwicklung und des Wachstums des Knochens strikt koordiniert werden; aber auch der adulte Knochen unterliegt einem permanenten Auf- und Abbau, dem sogenannten Knochenumbau.

Während der Embryonalentwicklung des Skeletts bilden sich zunächst Kondensationen undifferenzierter mesenchymaler Zellen, die nachfolgend als prächondrogene Kondensationen knorpelige Matrix sezernieren. Im Zuge der fortschreitenden Differenzierung wird zunächst ein knorpeliges Primordialskelett ausgebildet, welches später in der Entwicklung durch Osteo-/Chondroklasten resorbiert und durch von Osteoblasten synthetisierte Knochenmatrix ersetzt wird. Der Prozeß der Bildung von Skelettknochen wird als endochondrale Ossifikation bezeichnet.

Auch das Längenwachstum wie die Bruchheilung von Knochen erfolgt nach dem gleichen Prinzip der endochondralen Ossifikation. Das Längenwachstum des Knochens erfolgt bidirektional, wobei sukzessive knorpelige Strukturen aufgebaut, resorbiert und durch Knochenmatrix ersetzt werden. Von der Peripherie zum Zentrum des Knochens wird in der Wachstumszone ein Gradient sich differenzierender Chondrozyten ausgebildet. Es werden histologisch die Reservezone, die proliferative Zone, die prähypertrophe und die hypertrophe Zone unterschieden (Abbildung 1.8). Die ruhenden Zellen der Reservezone zeigen keine oder kaum Teilungsaktivität, während die proliferative Zone durch Zellvermehrung und Bildung chondrogener Matrix gekennzeichnet ist. Bereits in der prähypertrophen Zone sind die Zellen vollständig von Knorpelmatrix umgeben. Mit der Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten kann eine erste Kalzifizierung der Matrix beobachtet werden [Cancedda, 1995; Erlebacher, 1995].

Während der membranösen Ossifikation, die zur Ausbildung von Gesichts- und Schädelknochen führt, wird der Knochen direkt von Osteoblasten gebildet, eine Formung durch Knorpelgewebe als Zwischenstufe tritt hierbei nicht auf.



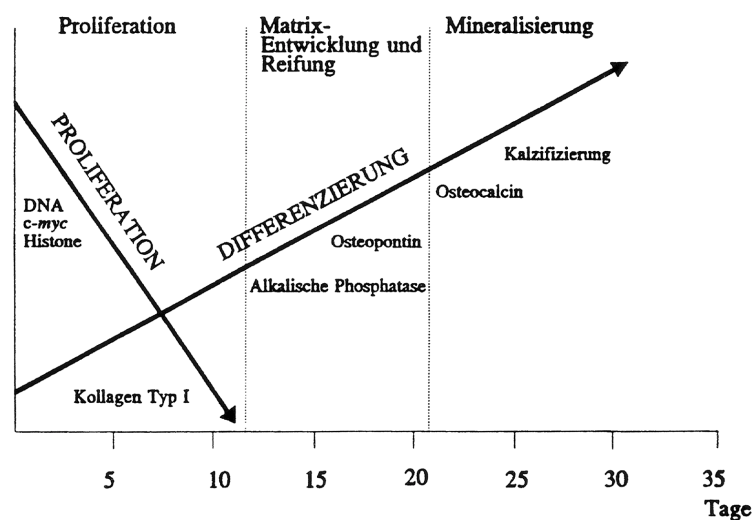


**Abbildung 1.8:** Schematische Darstellung der Differenzierungsstadien in der Knochenwachstumszone während des Knochen-Längenwachstums [Stevens, 1999]

Neben *in vivo* Studien können in geeigneten *in vitro* Zellsystemen Mechanismen und beteiligte Faktoren der Knorpel- und Knochendifferenzierung untersucht werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, den Einfluß diverser extrazellulärer Faktoren auf die Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten zu bestimmen. Daneben tragen sie aber auch zur Aufklärung und Entwicklung von Modellen der Signalweiterleitung und Regulation der Transkription im Zuge der Differenzierung bei.

Den Zusammenhang von Proliferation und der Expression spezifischer Gene einer distinkten Entwicklungssequenz während der Osteoblastendifferenzierung zeigt das *in vitro* Modell von Owen und Stein, 1990 am Beispiel von primären Osteoblastenzellkulturen aus fötalen Rattenkalvarien (Abbildung 1.9).

#### Zeitliche Abfolge der Osteoblasten-Entwicklung



**Abbildung 1.9:** Stadien der *in vitro*-Osteoblastenentwicklung nach Owen und Stein, 1990

Nach dem Modell von Owen und Stein stellen die ersten zwölf Tage eine Phase der Proliferation dar, die durch die Expression von Genen gekennzeichnet ist, welche im Zusammenhang mit der Zellzyklusregulation und dem Zellwachstum stehen. Desweiteren werden in dieser proliferativen Phase der Differenzierung Gene exprimiert, welche die Bildung der extrazellulären Matrix ermöglichen, wie etwa Kollagen Typ I.

In den folgenden acht bis neun Tagen wird die extrazelluläre Matrix einer Reihe von Modifikationen unterzogen, die sie in Bezug auf ihre Organisation und Zusammensetzung für die spätere Mineralisierung kompetent werden lassen. Beim Eintritt der Zellen in die Mineralisierungsphase sinkt die Expressionsrate der Alkalischen Phosphatase. Demgegenüber werden Gene exprimiert, die für die Mineralisierung relevant sind, wie beispielsweise Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin oder auch Proteoglykane [Reddi, 1997].

Somit ergeben sich drei aufeinanderfolgende Hauptabschnitte der Osteoblastendifferenzierung: Proliferation, Matrixentwicklung und -reifung. Diese Phasen der Differenzierung werden durch Transitionspunkte voneinander getrennt, die von den Zellen nicht ohne bestimmte Signale überschritten werden können. Die Signale und deren Regulation als solches sind noch weitgehend ungeklärt, wobei aber *Bone Morphogenetic Proteins* potentielle Kandidaten darstellen.

## 1.5 Aufgabenstellung

In der hier vorliegenden Studie findet als zelluläres Differenzierungssystem zur Untersuchung der frühen Chondrozyten- und Osteoblastenentwicklung die fibroblastoide Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  Verwendung, welche auf Mausembryonen früher Entwicklungsstadien zurückzuführen ist [Reznikoff, 1973]. Dieser Zelllinie wohnt die Potenz inne, in verschiedene mesenchymale Entwicklungsrichtungen zu differenzieren. So kann unter geeigneten Kulturbedingungen und entsprechender Stimulation die Ausprägung von Zelltypen mesenchymalen Ursprungs beobachtet werden [Taylor, 1979]. Desweiteren schafft das sensible Reagieren dieser Zelllinie auf Faktoren der TGF- $\beta$  Superfamilie ein geeignetes Modell zur Untersuchung von Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren und intrazellulären Mediatoren der frühen chondro-/osteogenen Differenzierung.

Bone Morphogenetic Protein-2 weist *in vivo* chondro-/osteoinduktive Eigenschaften auf und zeigt diverse Effekte auf verschiedene Zelltypen *in vitro* [Rosen, 1992; Sakou, 1998]. Welche BMP2-abhängigen Signalwege letztendlich zur Determinierung, Reifung und terminalen Differenzierung von mesenchymalen Zellen in der Knorpel- und Knochenbildung führen, ist weitgehend ungeklärt. Obwohl mögliche Bindungspartner für BMP-2 auf Ebene der Serin/Threonin-Rezeptoren (BMPR-IA, BMPR-IB, BMPR-II, ActR-I, ActR-II und ActR-IIB) und intrazelluläre Mediatoren aufgezeigt werden konnten, bleiben deren Funktionen und Zusammenspiel in der chondro-/osteogenen Entwicklung zu verifizieren [Yamashita, 1996].

Neben biochemischen Untersuchungen, Expressionsstudien *in vivo* und Inaktivierung distinkter Rezeptoren während der Embryonalentwicklung können zelluläre Systeme zur Klärung funktioneller Zusammenhänge dienen. Hierbei können durch Expression funktioneller oder inaktiver, dominant-negativer Rezeptoren bestimmte Signalwege oder -komponenten bevorzugt oder inhibiert werden (*gain-of-function/loss-of-function*). Die rekombinante Expression dominant-negativer Rezeptoren ermöglicht kompetitiv das selektive Ausschalten distinkter Signalwege (Abbildung 1.10).

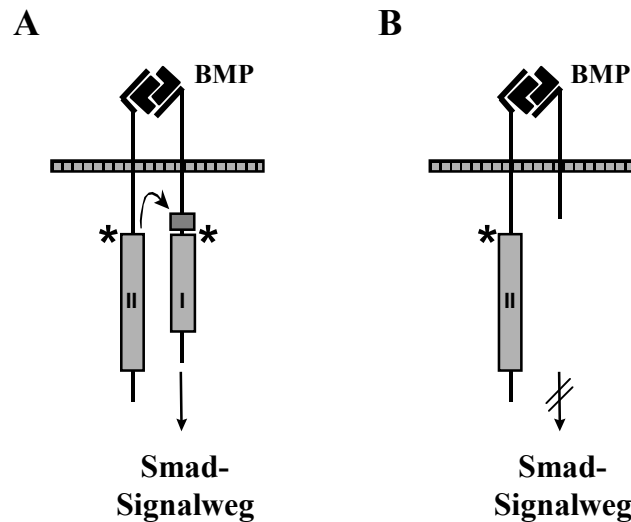


Abbildung 1.10: Struktur von parentalen (A) und dominant negativen (B) BMP Typ I Rezeptoren

Erste Experimente mit dominant-negativen Rezeptoren fanden zur Klärung der Funktionen des FGF-Rezeptors (*Fibroblast Growth Factor*) statt, einem Rezeptor mit zytosolischer Tyrosin-Kinaseaktivität und extrazellulärer FGF-Bindungsstelle. Die Deletion der enzymatischen Domäne und Überexpression dieser verkürzten, „truncated“ Rezeptorversion verhindern die Rezeptoraktivierung und Signalweiterleitung [Amaya, 1991]. Die Deaktivierung des Rezeptors ist auf eine Dimerisierung des Wildtyp- mit dem „truncated“ Rezeptor zurückzuführen. Eine weitere Erklärung wäre die nahezu vollständige Bindung freier Liganden durch den überexprimierten „truncated“ Rezeptor, der aufgrund der fehlenden Kinasedomäne das extrazelluläre Signal nicht weiterleitet [nach Harland, 1994]. Dieses System zeigte sich hinsichtlich BMP Rezeptoren in *Xenopus* aktiv und konnte durch die Verwendung des „truncated“ BMP-4 Typ I Rezeptors mit deletierter Serin/Threonin-Kinase-domäne Hinweise auf die Wirkungsweise dorso-ventral Mesoderm-induzierender Signale geben [Graff, 1994; Suzuki, 1994].

Im zellulären Differenzierungssystem der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt die rekombinante Expression von humanem BMP-2 zur Ausbildung distinkter mesenchymaler Zellpopulationen, wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten [Ahrens, 1993].

Im Zuge dieser Arbeit sollen die Beteiligung und Funktion der BMP Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB (alk-3 und alk-6 - *activin receptor like kinase 3 und 6*) als prominente Typ I Rezeptoren der BMP2-vermittelten Signalkaskade während der BMP2-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen charakterisiert werden. Die rekombinante Expression nativer und dominant-negativer Rezeptorversionen in BMP-2 exprimierenden und parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen soll tiefergehende Einblicke in die BMP-abhängige Entwicklung von Chondrozyten und Osteoblasten erlauben und ein Modell der Rezeptorbeteiligung im Hinblick auf die chondrogene oder osteogene Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen ermöglichen.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Vektorkonstruktion und molekulare Klonierung

Zum Evaluieren der *Bone Morphogenetic Protein -2* (BMP-2) abhängigen chondro- und osteogenen Differenzierung der murinen mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  im Hinblick auf beteiligte BMP-2 responsible Typ I Rezeptoren (BMPR-IA und BMPR-IB) wurden die nachfolgend aufgeführten cDNAs der BMP Signalkaskade in eukaryotische Expressionsvektoren kloniert.

Hierbei diente als Basisvektor zur Expression des humanen BMP-2 der Expressionsvektor „pBIG-2“, welcher einen konstitutiv aktiven SV-40 Promotor, die humane BMP-2 cDNA, ein IRES-Element (*internal ribosome entry site*) des Polio-Virus und eine  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin Fusions-cDNA trägt (Abbildung 2.2). Die cDNAs der jeweiligen Rezeptorvarianten wurden in den Expressionsvektor „pMTRIPLE“ kloniert (Abbildung 2.1.3), welcher einen konstitutiv aktiven MPSV-LTR (*myeloproliferative sarcom virus long terminal repeat*) als Promotor trägt.

Die verwendeten Methoden zur Vektorkonstruktion, molekularen Klonierung und Subklonierung sind den Kapiteln 5.1, 5.2 und 5.3 „Allgemeine Methoden zur Subklonierung von DNA“, „Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA“ und „Arbeiten mit *Escherichia coli*“ zu entnehmen. Zum Propagieren und Transformieren der verwendeten Vektoren wurden die Stämme *Escherichia coli* SURE zur Elektroporation respektive *Escherichia coli* JM109 zur Hitzeschock-Transformation eingesetzt. Zur Klonierung und Subklonierung verwendete Vektoren sind im Kapitel 2.1.5 aufgeführt. Die entsprechenden cDNA-Sequenzen sind dem Kapitel 7.2 zu entnehmen.

#### 2.1.1 Konstruktion des Expressionsvektors pBIG-2 (hBMP-2-IRES-Gal/neo)

Zur Konstruktion des Expressionsvektors pBIG-2, welcher mittels eines SV40-Promotors rekombinantes humanes BMP-2 und über ein IRES-Element ein  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin-Fusionsprotein exprimiert, wurden durch im folgenden näher erläuterte Methoden die entsprechenden Fragmente aus den Vektoren „pSBC1-SEAP“, „pPGK $\beta$ geobpA“ und „T<sub>7</sub>T<sub>3</sub>-BMP-2“ entnommen und zur Konstruktion des vollständigen Vektors „pBIG-2“ eingesetzt.

Als Ausgangsvektor zur Konstruktion des IRES-Vektors wurde der Vektor „pSBC1-SEAP“ genutzt (Abbildung 2.1). Das die alkalische Phosphatase kodierende Element „SEAP-secreted alkaline phosphatase“ wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und HindIII herausgeschnitten, die resultierenden überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, um anschließend mit Shrimp alkalischer Phosphatase dephosphoryliert zu werden. Der so linearisierte Vektor wurde über ein LMP-Gel aufgereinigt und mit Hilfe des JetSorb-Kits der Firma Genomed eluiert.

Die humane BMP-2 cDNA wurde über einen Restriktionsverdau mit EcoRI und PstI aus dem Expressionsvektor „T<sub>7</sub>T<sub>3</sub>“ herausgeschnitten, mit Klenow-Enzym aufgefüllt und ebenfalls über ein LMP-Gel aufgereinigt. Das BMP-2-Fragment wurde mittels des Wizard-Kits der Firma Promega zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten eluiert.

Die beiden Fragmente (BMP-2 und Vektorfragment pSBC1) wurden nach dem in Material und Methoden aufgeführten Prozeduren ligiert. Klone, die das Plasmid mit einer Einzelintegration der humanen BMP-2-cDNA in korrekter Orientierung trugen, dienten als Zielklone zur Subklonierung der  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin-Fusions-cDNA.

Hierzu wurde das BMP-2 und IRES-Element tragende Plasmid mittels eines NotI-Restriktionsverdaus linearisiert, mit Klenow-Enzym aufgefüllt, mit Shrimp alkalischer Phosphatase

dephosphoryliert und über ein LMP-Gel aufgereinigt. Die Elution des linearisierten Vektors erfolgte mit dem Wizard-Kit der Firma Promega zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten.

Der Vektor „pPGK $\beta$ geobpA“ wurde zur Gewinnung des  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin Fusionskonstruktes über einen partiellen Verdau mit dem Restriktionsenzym SmaI linearisiert (Abbildung 2.1). Der linearisierte Vektor wurde über ein LMP-Gel aufgereinigt und mit dem Wizard-Kit zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten eluiert. Der linearisierte Vektor wurde nachfolgend mit den Restriktionsenzymen HindIII, XbaI und XhoI verdaut. Das XbaI/SmaI-Fragment (3,9 kb) wurde mit Klenow aufgefüllt, über ein 1,3 %iges LMP-Agarosegel aufgereinigt und mittels des JetSorb-Kits der Firma Genomed eluiert.

Die beiden Fragmente - $\beta$ -Gal/neo und Vektorfragment BMP-2/IRES- wurden nach dem in Material und Methoden aufgeführten Prozedere ligiert. Klone, die das Plasmid mit einer Einzelintegration des  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin Fragmentes in korrekter Orientierung trugen, dienten zur Präparation von Plasmid-DNA in quantitativem Maßstab; dieser Vektor wird in den folgenden Ausführungen als pBIG-2 bezeichnet. Die subklonierten Fragmente -hBMP-2 und  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin- wurden gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ sequenziert.

### 2.1.2 Konstruktion des Kontrollvektors pKIG (Kontrolle-IRES-Gal/neo)

Als Ausgangsvektoren zur Konstruktion des Kontrollvektors wurden die Vektoren „pBIG-2“ und „pSBC1-SEAP“ verwendet.

Das alkalische Phosphatase kodierende Fragment (SEAP) des Vektors „pSBC1-SEAP“ wurde, wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, herausgeschnitten, die DNA-Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, über ein LMP-Gel aufgereinigt, mit dem JetSorb-Kit von Genomed eluiert und ligiert. Der prozessierte Vektor wurde einem Restriktionsverdau mit KpnI und NheI unterzogen, so daß das Vektorfragment, welches den Promotor und das Ampicillin-Resistenzgen trägt, über ein LMP-Gel aufgereinigt und mit dem Wizard-Kit der Firma Promega eluiert werden konnte.

Der Vektor „pBIG-2“ wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen KpnI und NheI geschnitten, so daß das IRES-Gal/neo-Fragment über ein LMP-Gel aufgereinigt und mit dem Wizard-Kit zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten eluiert werden konnte.

Nach Ligation der Fragmente dienten Klone, die das Plasmid mit einer Einzelintegration der Fragmente in korrekter Orientierung aufwiesen, zur Präparation von Plasmid-DNA in quantitativem Maßstab; dieser Vektor wird in den folgenden Ausführungen als pKIG bezeichnet.

### 2.1.3 Subklonierung der BMPR-IA und BMPR-IB Rezeptorvarianten

Die cDNA des humanen BMPR-IA, welche in dem Vektor „pcDNA-1“ der Firma Invitrogen vorlag, wurde in den Vektor „pMTRIPLE“ subkloniert. Hierzu wurde das BMPR-IA-Fragment mit Hilfe der Restriktionsenzyme XbaI und HindIII herausgeschnitten, mit Klenow-Enzym aufgefüllt, über ein LMP-Gel aufgereinigt und mittels des Wizard-Kits der Firma Promega eluiert. Das BMPR-IA-Fragment wurde in den mit MscI geschnittenen, mit Shrimp alkalischer Phosphatase dephosphorylierten und über LMP-Agarose aufgereinigten Expressionsvektor „pMTRIPLE“ ligiert. Klone mit Einzelintegration und korrekter Orientierung dienten zur Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab. Die Sequenzierung des subklonierten Fragmentes wurde gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ durchgeführt; verwendete interne Oligonukleotide zur Sequenzierung wurden mittels des FluoroAMP T4-Kinase Green Oligonucleotide Labeling System Fluoreszenz-markiert (Kapitel 5.2.8).

Um die dominant-negative Version des BMPR-IA zu generieren, wurden spezifische Oligonukleotide (Kapitel 7.1.1: Alk-3 truncated human 2) eingesetzt, die zur Amplifikation eines 596 bp-Fragmentes führten, welches die extrazelluläre, die Transmembrandomäne und 12 AS der zytosolischen Domäne von BMPR-IA kodiert. Als Ausgangs-DNA für die PCR-Reaktion diente linearisierte cDNA von BMPR-IA im Vektor „pcDNA-1“. Das PCR-Produkt wurde über ein LMP-Agarosegel aufgereinigt und eluiert. Durch die Verwendung von Klenow-Enzym wurden stumpfe DNA-Enden erzeugt. Nach der Phosphorylierung der 5'-DNA-Enden mit T<sub>4</sub>-Polynukleotid-Kinase wurde das zuvor phenolisierte Produkt in den MscI geschnittenen, dephosphorylierten und über LMP-Agarose aufgereinigten Vektor „pMTRIPLE“ ligiert. Klone mit Einzelintegration und korrekter Orientierung dienten zur Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab; die Sequenzierung des subklonierten Fragmentes wurde gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial zur Subklonierung des murinen BMPR-IB in den eukaryotischen Expressionsvektor „pMTRIPLE“ diente ein pGEM3Z-Derivat, welches die cDNA des murinen BMPR-IB trug. Die BMPR-IB cDNA wurde mittels spezifischer Oligonukleotide (Kapitel 7.1.1 Alk-6 full length murine) amplifiziert, wobei im 5'-Bereich eine EcoRI und im 3'-Bereich eine Sall Restriktionsschnittstelle eingeführt wurde. Das PCR-Amplifikat wurde, nachdem eine Aufreinigung über ein LMP-Agarosegel erfolgte, entsprechend der eingeführten Restriktionsschnittstellen geschnitten, phenolisiert und in den EcoRI und Sall linearisierten Vektor „pMTRIPLE“ ligiert. Resultierende Klone wurden gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ sequenziert und dienten zur Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab.

Die cDNA des murinen dominant-negativen BMPR-IB, welche im Vektor „pGEM3Z“ vorlag, wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten und über ein LMP-Agarosegel aufgereinigt. Das EcoRI/BamHI-Fragment wurde in den EcoRI und BamHI linearisierten Expressionsvektor „pMTRIPLE“ ligiert. Resultierende Klone wurden gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ sequenziert und dienten zur Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab.

#### **2.1.4 Mutagenese der konstitutiv-aktiven BMPR-IB Rezeptorvariante**

Durch einen einzelnen Aminosäureaustausch (Q > D) innerhalb der GS-Aktivierungsdomäne wurde ein konstitutiv aktiver BMP Typ IB Rezeptor generiert [Wieser, 1995; Zou, 1997]. Als Ausgangsvektoren zur Mutagenese wurde der in Kapitel 2.1.3 beschriebene BMPR-IB exprimierende Vektor eingesetzt.

Durch die Verwendung mutagener Oligonukleotide (Kapitel 7.1.1; ca-alk6) wurde in der Aminosäuresequenz des murinen BMPR-IB an Position 203 die Aminosäure Glutamin durch Asparaginsäure mittels des QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Kapitel 5.2.5.2) ausgetauscht. Nach Transformation in Epicurian Coli XL1-Blue wurden resultierende Klone gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ sequenziert und dienten zur Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab.

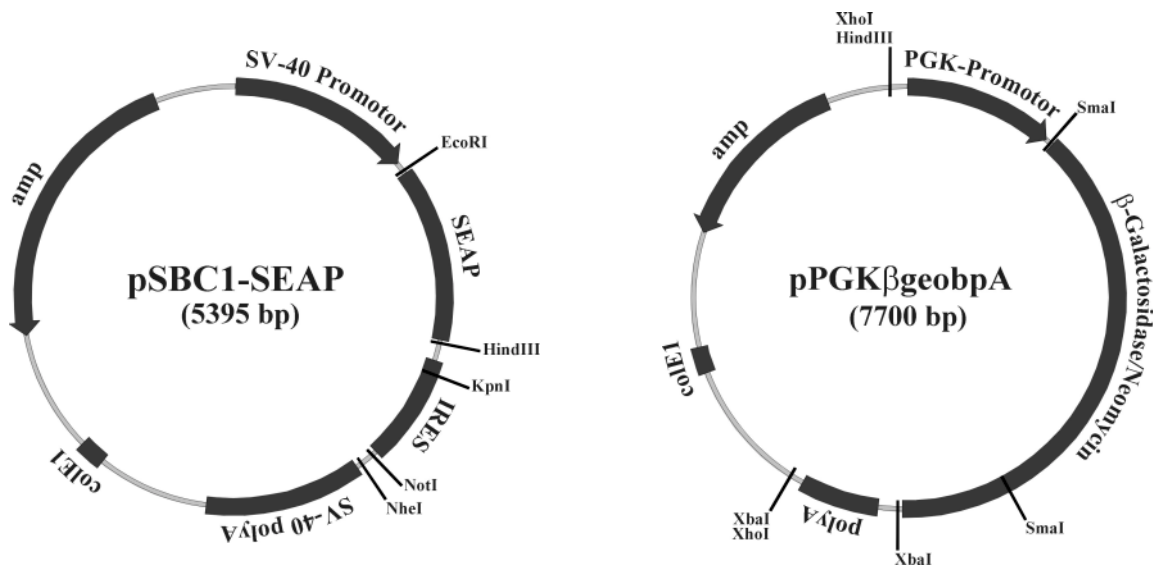
### 2.1.5 Molekulare Klonierung der humanen GDF-5 cDNA

Humaner Nasenseptumknorpel diente zur Isolierung humaner knorpelspezifischer mRNA. Die Chondrozyten des Septumknorpels wurden gemäß Kapitel 5.4.8 „Isolierung primärer Chondrozyten aus Knorpelgeweben“ aufgearbeitet, um knorpelspezifische Gesamt-RNA zu isolieren (Kapitel 5.5.1), welche zur Gewinnung von mRNA eingesetzt wurde (Kapitel 5.5.2). Die resultierende mRNA diente zur Synthese von knorpelspezifischer cDNA unter Verwendung von Oligo-dT<sub>12-18</sub>-Oligonukleotiden (Kapitel 5.5.3).

Zum Amplifizieren der humanen GDF-5 cDNA wurden spezifische, die kodierende Sequenz flankierende Oligonukleotide verwendet, so daß im 5'-Bereich der cDNA eine BamHI Restriktionsschnittstelle eingeführt werden konnte (Kapitel 7.1.1: GDF-5 human). Das resultierende PCR-Amplifikat wurde direkt zum TA-Cloning in den Vektor „pGEM-T“ eingesetzt (Kapitel 5.2.6). Klone mit einer GDF-5 Insertion dienten zur Präparation von Plasmiden im analytischen Maßstab, welche gemäß des Protokolls zum „Cycle-Sequencing“ sequenziert wurden. Die humane GDF-5 cDNA wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme BamHI und Sall geschnitten und in den BamHI und Sall linearisierten Vektor „pMTRIPLE“ ligiert. Klone mit korrekter Insertion dienten zur Präparation von Plasmid-DNA im quantitativen Maßstab.

Die klonierte humane GDF-5 cDNA weist zwei Punktmutationen auf, welche jeweils zu einem funktionell homologen Aminosäureaustausch führen (Kapitel 7.2.7).

### 2.1.6 Eingesetzte Vektoren



**Abbildung 2.1.1:** Ausgangsvektoren „pSBC1-SEAP“ und „pPGKβgeobpA“ zur Klonierung des BMP-2 exprimierenden IRES-Konstruktes (pBIG-2)

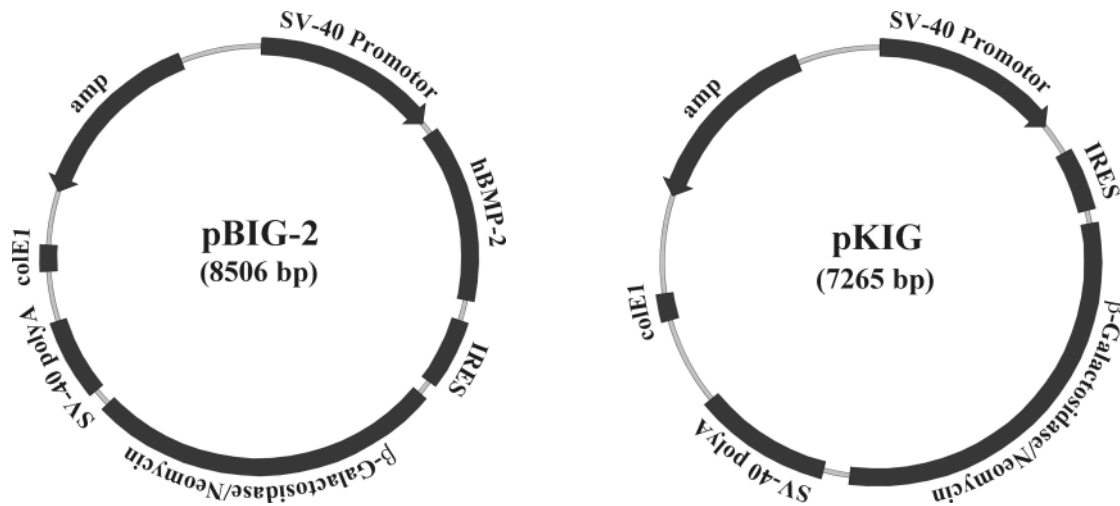


Abbildung 2.1.2: Basisvektor „pBIG-2“ zur Expression der humanen BMP-2 cDNA mit  $\beta$ -Galaktosidase/Neomycin-Fusion und zugehöriger Kontrollvektor „pKIG“

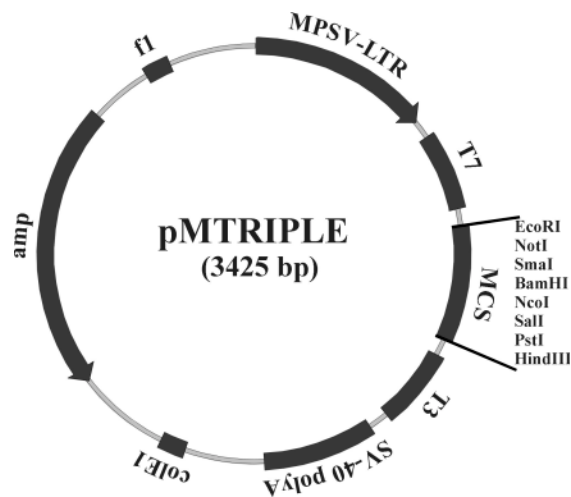


Abbildung 2.1.3: Eukaryotischer Expressionsvektor „pMTRIPLE“ zur Expression der Rezeptorvarianten und der humanen GDF-5 cDNA

Die in den Abbildungen 2.1.1, 2.1.2 und 2.1.3 verwendeten Kürzel zur Beschreibung der Plasmideigenschaften sind dem Abkürzungsverzeichnis (Kapitel 7.6) zu entnehmen.

Mithin stehen mit den Vektoren „pKIG“ und „pBIG-2“ Plasmidkonstrukte zur konstitutiven Expression des humanen BMP-2 im hier verwendeten BMP-2 abhängigen Differenzierungssystem zur Verfügung. Die über ein virales IRES-Element korrespondierende Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin Fusionsproteins ermöglicht die Selektion BMP-2 exprimierender Zellen bei gleichzeitiger Möglichkeit zur Färbung der Zellen im Hinblick auf etwaige *in vivo* Transplantationsexperimente.

Desweiteren stehen die verschiedenen cDNA-Varianten der BMP Typ I Rezeptoren und die humane GDF-5 cDNA unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors des MPSV-LTR.



## 2.2 Stabile Transfektion der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T½

Die Transfektionen der in Kapitel 2.1 aufgeführten Expressionsvektoren für BMP-2, GDF-5 und der entsprechenden Rezeptorvarianten in die murine mesenchymale Vorläuferzelllinie C3H10T½ [Reznikoff, 1973] wurde nach den Verfahren der Liposomen-vermittelten Transfektion und Kalziumphosphat-Präzipitation durchgeführt (Kapitel 5.4.6), um eine permanente Expression der entsprechenden cDNAs durch Integration in das Genom der Vorläuferzelllinie C3H10T½ zu ermöglichen. Desweiteren wurden durch die stabile Transfektion der Expressionskonstrukte „pKIG“ und „pMTRIPLE“, welche keine Insertion tragen, Kontrollzelllinien etabliert.

Die Selektion der stabil transfizierten Zellklone erfolgte über Kotransfektion der Resistenz-vermittelnden Selektionsplasmide „pBSpacΔp“ und „pAG-60“ [de la Luna, 1988; Colbère-Garapin, 1981]; im Falle der Vektoren „pKIG“ und „pBIG-2“ wird die Resistenz gegenüber Geneticin durch Expression des β-Galaktosidase-Neomycin Fusionsproteins ermöglicht.

Durch die Integration des Selektionsplasmids wird den transfizierten Zellen ein Überleben und Vermehrung in Puromycin-haltigem (pBSpacΔp) bzw. Geneticin-haltigem (pAG-60) Medium ermöglicht, so daß alle Zellen der Transfektionskultur absterben, die kein Selektionsplasmid aufgenommen haben. Hierbei fungiert Puromycin als Aminoacyl-tRNA-Analogon, welches durch die Ribosomen in die wachsende Polypeptidkette eingebaut wird und zu einer frühzeitigen Termination der Translation führt. Die Resistenz ist durch die Expression von Puromycin-N-Acetyltransferase (PAC) gegeben.

Geneticin oder auch G418 aus *Streptomyces fradiae* hingegen blockiert als Aminoglykosid-Antibiotikum die Proteinbiosynthese auf der Ebene der Ribosomen und wirkt toxisch auf Bakterien, Hefen, Pflanzen, Protozoen und Säugerzellen. Geneticin inhibiert durch Bindung an ribosomale Proteine der 80S Ribosomen die Proteinbiosynthese, wobei die Interaktion zwischen Ribosom, mRNA und tRNA empfindlich gestört wird. Die Resistenz gegenüber G418 wird durch das Enzym Aminoglykosid-Phosphotransferase 3' I (APH (3') I) oder auch Aminoglykosid-Phosphotransferase 3' II (APH (3') II) vermittelt.

Um eine Integration in das Wirtsgenom und die Weitergabe der Information an die Tochterzellen zu gewährleisten, wurde der Selektionsdruck sukzessive innerhalb von drei Wochen von 2,5 µg/ml Puromycin als Ausgangs- auf 4,0 µg/ml Puromycin als Endkonzentration gesteigert, so daß Zellklone erzielt werden konnten, die in weiterführenden Experimenten in Puromycin-haltigem Medium (2,5 µg/ml Puromycin) kultiviert wurden; bei der Verwendung von G418 wurde die Konzentration im Kulturmedium von 500 µg/ml auf 750 µg/ml G418 erhöht, welche für weitere Experimente beibehalten wurde.

### 2.2.1 Transfektion zur Expression des humanen *Bone Morphogenetic Protein-2*

Die rekombinante Überexpression von humanem BMP-2 in der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T½ führt zur Ausbildung distinkter mesenchymaler Zelltypen, welche sich aufgrund histologischer Färbungen und Analyse spezifischer Markergene als Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten darstellen. Dieses zelluläre Differenzierungssystem dient als Basis zur Analyse der BMP-Rezeptoren in der BMP-2 abhängigen chondro- und osteogenen Differenzierung.

Zur stabilen Expression des humanen BMP-2 und zum Etablieren der entsprechenden Kontroll-Zelllinie wurden C3H10T½-Zellen mit den Expressionskonstrukten „pBIG-2“ und „pKIG“ mittels Kalziumphosphat-Präzipitation transfiziert (Kapitel 5.4.6.1) und zur Selektion mit Selektionsmedium (supplementiertes DME und 500 µg/ml G418) kultiviert, so daß nach zirka drei Wochen bei sukzessiver Erhöhung des Selektionsdruckes auf 750 µg/ml G418

Zellklone ausgemacht werden konnten, die aufgrund der integrierten Konstrukte die Selektion mit G418 überlebten. Als Kontrolle der Selektion dienten nicht-transfizierte C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche bereits nach wenigen Tagen unter Selektionsdruck abstarben.

Nach Etablierung dieser Zelllinien wurde zum Nachweis der Integration und Aktivität der Expressionskonstrukte „pBIG-2“ und „pKIG“ die Überexpression der entsprechenden mRNAs mittels RT-PCR überprüft. Hierzu wurden jeweils 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> der entsprechenden Zelllinien in kleinen Roux-Flaschen ausgesät und bis zur zellulären Konfluenz kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen geerntet, um die Gesamt-RNA zu isolieren (Kapitel 5.5.1) und cDNA zu synthetisieren (Kapitel 5.5.3).

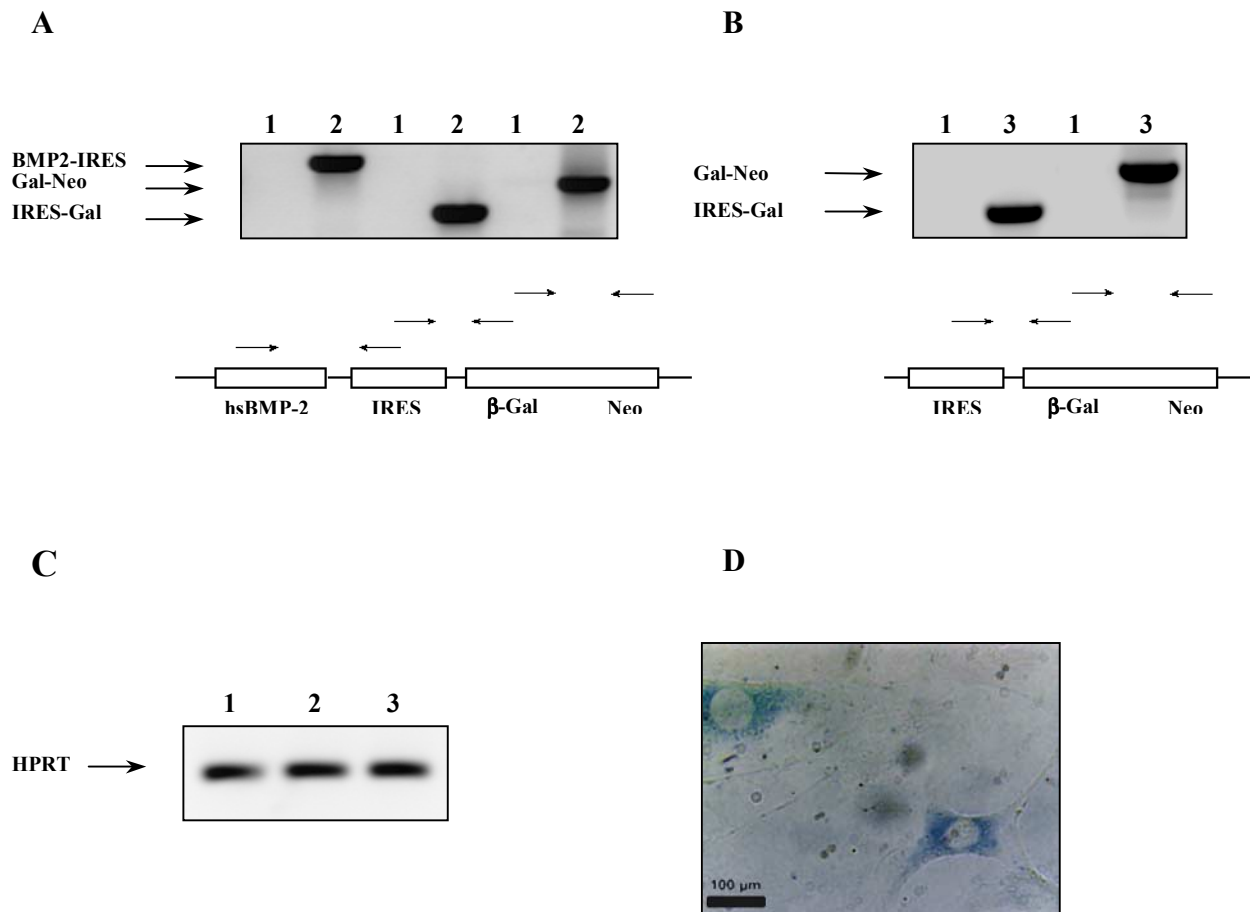


Abbildung 2.2.1: Etablierung der humanes BMP-2 exprimierenden und der Kontroll-Zelllinie

- A) rekombinante Expression der BIG-2 cDNA; 1 μl cDNA, 30 Zyklen  
nicht-transfizierte C3H10T $\frac{1}{2}$  (1), „pBIG-2“ transfizierte C3H10T $\frac{1}{2}$  (2)
- B) rekombinante Expression der KIG cDNA; 1 μl cDNA, 30 Zyklen  
nicht-transfizierte C3H10T $\frac{1}{2}$  (1), „pKIG“ transfizierte C3H10T $\frac{1}{2}$  (3)
- C) HPRT-Abgleich der nicht-transfizierten (1), „pBIG-2“ (2) und „pKIG“ (3)  
transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ ; 1 μl cDNA, 30 Zyklen
- D) X-Gal Färbung zum Nachweis der Expression des β-Galaktosidase-Neomycin  
Fusionsproteins in „pBIG-2“ transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$

Mit Hilfe der RT-PCR-Methode (Kapitel 5.2.4), welche revers transkribierte mRNA (ss-cDNA) als Ausgangs-DNA für die PCR-Reaktion nutzt, wurden die verschiedenen cDNAs hinsichtlich ihres revers transkribierten mRNA-Anteils egalisiert, indem die Expression des Haushaltsgenes HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) mit spezifischen Oligonukleotiden bestimmt wurde (Kapitel 7.1.3: HPRT), so daß durch Verdünnung der entsprechenden cDNAs eine annähernd gleiche Expressionshöhe an HPRT detektiert werden konnte. Dieser HPRT-Abgleich basiert auf dem Prinzip, daß das Haushaltsgen während der Differenzierung zu differierenden mesenchymalen Zelltypen in seiner Expressionshöhe nicht moduliert wird. Auf diese Weise egalisierte cDNAs zeigen einen vergleichbaren revers transkribierten mRNA-Anteil.

Über HPRT egalisierte cDNAs können weiterführend hinsichtlich des Anteils verschiedenster cDNAs untersucht werden; hier war es zunächst von Interesse, die Überexpression von humanem BMP-2 respektive der Kontroll-cDNA mittels spezifischer Oligonukleotide, welche sich ausschließlich gegen rekombinante cDNA richten, nachzuweisen (Kapitel 7.1.2). Desweiteren wurde die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin Fusionsproteins durch Färbung mit X-Gal gezeigt (Kapitel 5.4.7.7).

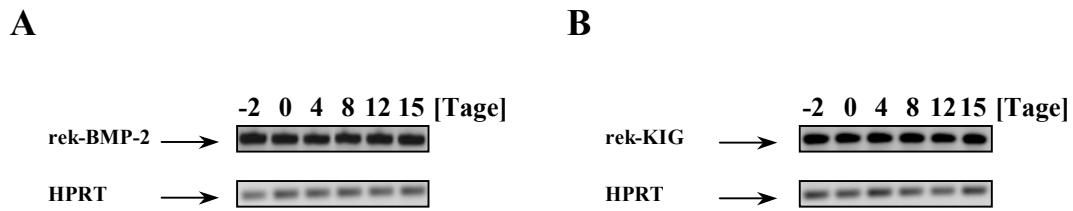
Der Abbildung 2.2.1 ist zu entnehmen, daß durch stabile Transfektion der Expressionskonstrukte „pBIG-2“ und „pKIG“ eine humanes BMP-2 exprimierende und eine entsprechende Kontroll-Zelllinie etabliert werden konnte. Die rekombinante BIG-2-mRNA in ihren einzelnen Abschnitten (hsBMP-2, IRES-Element,  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin Fusion) konnte im Gegensatz zu den nicht-transfizierten in den „pBIG-2“ transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (r-BMP-2) mittels RT-PCR unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide nachgewiesen werden (Abbildung 2.2.1 A). Weiterhin wird die Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin Fusionsproteins durch die positive X-Gal Färbung angezeigt (Abbildung 2.2.1 D).

Die Expression der entsprechenden Kontroll-mRNA, welche aus dem IRES-Element und der  $\beta$ -Galaktosidase-Neomycin Fusion besteht, konnte ebenfalls mit Hilfe der RT-PCR in den „pKIG“ transfizierten Zellen (r-C3H10T $\frac{1}{2}$ ) aufgezeigt werden (Abbildung 2.2.1 B).

Um einen Überblick über das Ausmaß und die Stabilität der Expression in den transfizierten Zellen zu erlangen, wurde die Expression der BIG-2 und der KIG cDNA über einen längeren Kultivierungszeitraum hinweg verfolgt. Hierzu wurden die entsprechenden Zelllinien über einen Zeitraum von 15 Tagen kultiviert; sogenannte Differenzierungskultur. Die Zelllinien wurden zu jeweils 10.000 Zellen pro cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche in kleinen Roux-Flaschen ausgesät und in supplementiertem DME (10%FCS/Pen/Strep/750  $\mu$ g/ml G418) bis zur Konfluenz kultiviert.

Nach Erreichen der zellulären Konfluenz (Tag 0) erfolgte die weitere Kultivierung in Differenzierungsmedium (supplementiertes DME/50 $\mu$ g/ml Ascorbat/10mM  $\beta$ -Glycerolphosphat), welches alle zwei Tage erneuert wurde. Dabei fördert Ascorbat die Kollagensynthese [Jeffrey, 1966], während  $\beta$ -Glycerolphosphat als zusätzliche organische Phosphatquelle die Mineralisierung ermöglicht [Owen, 1990] und die Aktivität Alkalischer Phosphatase in osteoblastoiden Zellen stimuliert [Quarles, 1992].

In definierten Zeitintervallen (2 Tage vor und 0, 4, 8, 12 und 15 Tage nach Konfluenz) wurden Zellen jeweils einer kleinen Roux-Flasche geerntet und dienten der Isolierung der Gesamt-RNA, cDNA-Synthese und RT-PCR-Analyse (Kapitel 5.5.1, 5.5.3 und 5.2.4). Um die Fremdgenexpression zu verfolgen, wurden die verschiedenen cDNA-Proben hinsichtlich ihrer rekombinanten Expression geprüft; die gewonnenen cDNAs dienten desweiteren zur Untersuchung der in Kapitel 2.4 dargelegten Änderungen des Expressionsmusters hinsichtlich der chondro-/osteogenen Differenzierung. Zuvor wurden die cDNA-Proben mittels eines HPRT-Abgleichs egalisiert.



**Abbildung 2.2.2:** RT-PCR-Analyse der rekombinanten Expression in den konstitutiv exprimierenden Zelllinien zu entsprechenden Kulturzeitpunkten

- A) Überexpression humaner BMP-2 cDNA und HPRT-Expression in r-BMP-2  
BMP2-IRES und RT-HPRT Oligonukleotide, 1 µl cDNA, 30 Zyklen
- B) Überexpression der KIG Kontroll-cDNA und HPRT-Expression in r-C3H10T<sup>1/2</sup>  
IRES-Gal und RT-HPRT Oligonukleotide, 1 µl cDNA, 30 Zyklen

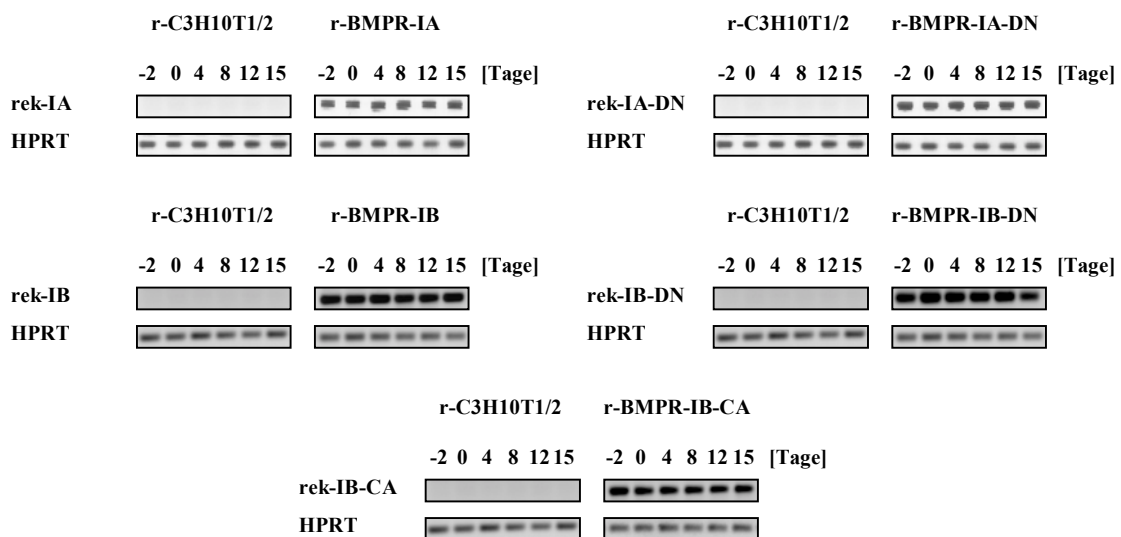
Laut Abbildung 2.2.2 konnte unter Beibehaltung des Selektionsdrucks eine stabile Expression der rekombinanten humanen BMP-2 cDNA in der Zelllinie r-BMP-2 und die stabile Expression der Kontroll-mRNA in der Zelllinie r-C3H10T<sup>1/2</sup> erzielt werden. Weiterhin wurden die cDNA-Proben der entsprechenden Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression des Haushaltsgens HPRT abgeglichen.

## 2.2.2 Transfektion zur Expression der *Bone Morphogenetic Protein* Typ I Rezeptoren und ihrer Rezeptorvarianten

Nach dem Etablieren der BMP-2 exprimierenden Zelllinie als Basis des BMP2-abhängigen zellulären Differenzierungssystems wurden Doppeltransfektanten generiert, welche neben humanem BMP-2 cDNAs der BMP Typ I Rezeptoren BMPR-IA und BMPR-IB konstitutiv als funktionelle („full length“) oder verkürzte („truncated“) Version exprimieren. Hierbei wird das BMP-2 Signal über die funktionellen Rezeptoren weitergeleitet, während die verkürzten Versionen als dominant-negative Rezeptoren zu einer Unterbrechung der Signalkaskade führen. Ferner wurden die Rezeptorvarianten sowie konstitutiv aktive Versionen der BMPR-I stabil in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen transfiziert, um den Einfluß der jeweiligen Rezeptoren auf die Differenzierungseigenschaften parentaler C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu ermitteln.

Um die entsprechenden Rezeptorvarianten stabil in den BMP-2 exprimierenden und in den parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu etablieren, wurde auf eine liposomale Transfektionsmethode zurückgegriffen (Kapitel 5.4.6.2). Zur Selektion der entsprechenden Zelllinien wurde das Selektionsplasmid „pBSpac $\Delta$ p“ kotransfiziert, so daß Zellklone generiert werden konnten, die in Puromycin-haltigem (2,5  $\mu$ g/ml Puromycin) beziehungsweise Puromycin- und G418-haltigem Medium (2,5  $\mu$ g/ml Puromycin, 750  $\mu$ g/ml G418) Wachstum und Überleben zeigten. Propagierte Einzelklone wurden, wie im Kapitel 2.1.1 beschrieben, hinsichtlich ihrer rekombinanten Expression der Rezeptorvarianten analysiert und vereinigt, so daß Mischklone aus zehn bis fünfzehn Einzelklonen für nachfolgende Differenzierungsstudien zur Verfügung standen (hier nicht explizit dargestellt).

A



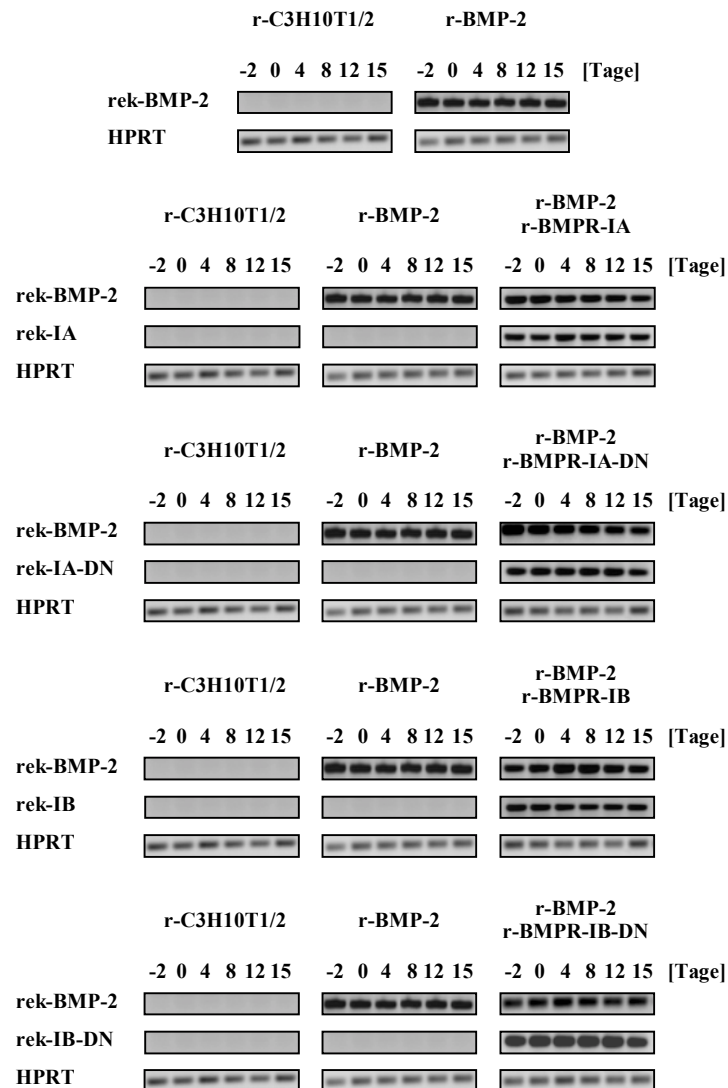
**B**

Abbildung 2.2.3: RT-PCR-Analyse der rekombinanten Expression in den konstitutiv exprimierenden Zelllinien zu entsprechenden Kulturzeitpunkten

- A) Überexpression der rekombinanten Rezeptorvarianten und HPRT-Expression in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen  
 B) Überexpression der rekombinanten Rezeptorvarianten und HPRT-Expression in der humanes BMP-2 exprimierenden Zelllinie r-BMP-2

Die hier eingesetzten Oligonukleotide (Kapitel 7.1.2) zum Nachweis der Expression von Rezeptorvarianten und BMP-2 richten sich ausschließlich gegen rekombinante cDNA, 1  $\mu$ l cDNA, 30 Zyklen

Der HPRT-Abgleich erfolgte mittels RT-HPRT Oligonukleotiden, 1  $\mu$ l cDNA, 30 Zyklen

Gemäß der Abbildung 2.2.3 konnten Zelllinien etabliert werden, die differierende Rezeptorvarianten zum einen in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Abbildung 2.2.3 A) und zum anderen in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Abbildung 2.2.3 B) rekombinant exprimieren. Zudem konnten die cDNA-Proben der entsprechenden Zelllinien hinsichtlich ihrer Expression des Haushaltsgens HPRT abgeglichen werden. Somit stehen Zelllinien zur Analyse der Rezeptor-vermittelten Modulation der chondro-/osteogenen Differenzierung in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in parentalem und rekombinantem BMP-2 Hintergrund zur Verfügung.

So werden in den parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen die funktionellen BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren (r-BMPR-IA und r-BMPR-IB), deren dominant-negative, „truncated“ Versionen (r-BMPR-IA-DN und r-BMPR-IB-DN) sowie der konstitutiv-aktive Typ IB Rezeptor (r-BMPR-IB-CA) rekombinant exprimiert.

Desgleichen erfolgt die rekombinante Expression der funktionellen und dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren in den BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen; die entsprechenden Zelllinien sind dem Kapitel 2.2.4 „Übersicht der etablierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinien“ zu entnehmen.

Die hier aufgeführten Differenzierungskulturen dienen zur Erfassung der modifizierten Expressionsprofile im Hinblick auf die chondro-/osteogene Differenzierung, welche nachfolgend im Kapitel 2.4 dargestellt sind.

### **2.2.3 Transfektion zur Expression des humanen *Growth and Differentiation Factor-5* und *Bone Morphogenetic Protein* Typ I Rezeptoren**

Neben BMP-2 und BMP-4 gelten BMP-7 und GDF-5 als Liganden der BMP Typ I Rezeptoren in der BMP-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung (Kapitel 1.2.1).

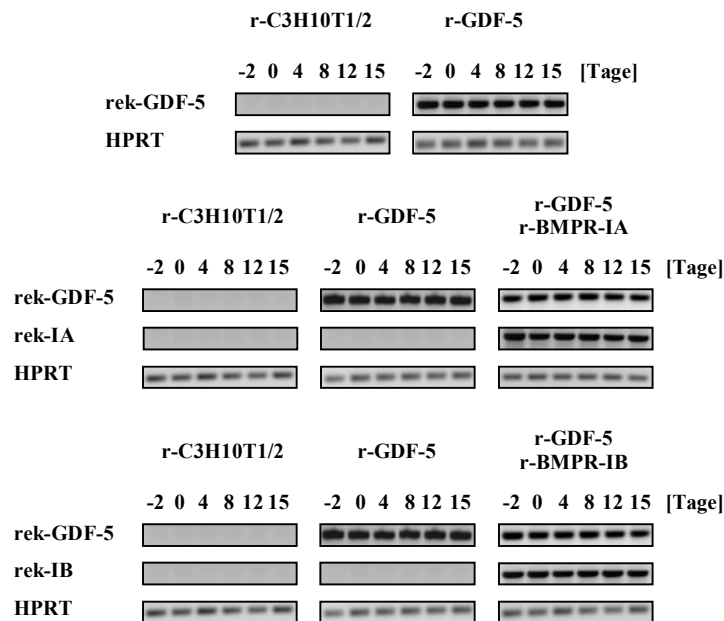
Zum Verifizieren der GDF-5 abhängigen Differenzierung in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurde zur konstitutiven Expression von humanem GDF-5 der korrespondierende Expressionsvektor durch liposomale Transfektion und Kotransfektion des Selektionsplasmids „pBSpac $\Delta$ p“ stabil in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen etabliert (Kapitel 5.4.6.2). Einzelne Zellklone, die unter Selektionsdruck Wachstum und Überleben in Puromycin-haltigem Medium (2,5  $\mu$ g/ml Puromycin) zeigten, wurden hinsichtlich ihrer rekombinanten Expression von humanem GDF-5 mittels RT-PCR geprüft und vereinigt. Diese aus zehn bis fünfzehn Einzelklonen bestehende Zelllinie diente im weiteren zur stabilen liposomalen Transfektion der funktionellen BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren unter Verwendung des kotransfizierten Selektionsplasmids „pAG-60“.

Einzelklone wurden wiederum im Hinblick auf die rekombinante Expression von GDF-5 respektive der BMP Typ I Rezeptoren überprüft und vereinigt. Mischklone aus zehn bis fünfzehn Einzelklonen dienten zur weiteren Analyse ihres Differenzierungspotentials unter Selektionsbedingungen (2,5  $\mu$ g/ml Puromycin und 750  $\mu$ g/ml G418).

Zum Etablieren einer geeigneten Kontroll-Zelllinie wurden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen mit den Selektionsplasmiden „pBSpac $\Delta$ p“ und „pAG-60“ stabil liposomal transfiziert und wie beschrieben unter Selektionsdruck kultiviert. Resultierende Zellklone wurden vereinigt und zeigen Wachstum und Überleben unter Selektionsbedingungen.

Die hier dargestellten Zelllinien zur Expression von humanem GDF-5 (r-GDF-5) und den funktionellen BMP Typ I Rezeptoren in GDF-5 exprimierenden Zellen (r-GDF-5/r-BMPR-IA und r-GDF-5/r-BMPR-IB) dienen zur Ermittlung ihres chondro-/osteogenen Potentials in Differenzierungskulturen über einen Zeitraum von fünfzehn Tagen (Kapitel 2.4).

Der Abbildung 2.2.4 zufolge konnte unter Selektionsbedingungen eine konstitutive Expression des rekombinanten GDF-5 und der BMP Typ I Rezeptoren bei gleichzeitiger Expression von GDF-5 über den Kulturzeitraum erzielt werden. Weiterhin wurden die gewonnen Proben hinsichtlich der Expressionshöhe des Haushaltgens HPRT abgeglichen.



**Abbildung 2.2.4:** RT-PCR-Analyse der rekombinanten Expression in den konstitutiv exprimierenden Zelllinien zu entsprechenden Kulturzeitpunkten

Überexpression des rekombinanten GDF-5, der GDF-5/BMPR-I Doppeltransfektanten und HPRT-Expression in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide (Kapitel 7.1.2) zum Nachweis der Expression von Rezeptoren und GDF-5 richten sich ausschließlich gegen rekombinante cDNA, 1  $\mu$ l cDNA, 30 Zyklen  
Der HPRT-Abgleich erfolgte mittels RT-HPRT Oligonukleotiden, 1  $\mu$ l cDNA, 30 Zyklen

## 2.2.4 Übersicht der rekombinanten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinien

<b>r-BMP-2</b>	Human Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)
<b>r-BMPR-IA</b>	„full length“ human BMP Typ IA Rezeptor (BMPR-IA)
<b>r-BMPR-IA-DN</b>	„truncated“ human BMP Typ IA Rezeptor (BMPR-IA-DN)
<b>r-BMPR-IB</b>	„full length“ murine BMP Typ IB Rezeptor (BMPR-IB)
<b>r-BMPR-IB-DN</b>	„truncated“ murine BMP Typ IA Rezeptor (BMPR-IB-DN)
<b>r-BMPR-IB-CA</b>	konstitutiv aktiver human BMP Typ IB Rezeptor (BMPR-IB-CA)
<b>r-BMP-2/r-BMPR-IA</b>	Human BMP-2 und human BMPR-IA
<b>r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN</b>	Human BMP-2 und human BMPR-IA-DN
<b>r-BMP-2/r-BMPR-IB</b>	Human BMP-2 und murine BMPR-IB
<b>r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN</b>	Human BMP-2 und murine BMPR-IB-DN
<b>r-C3H10T<math>\frac{1}{2}</math></b>	Kontroll-Zelllinie (pKIG / pBSpac $\Delta$ p / pPAG-60)
<b>r-GDF-5</b>	Human Growth and Differentiation Factor-5 (GDF-5)
<b>r-GDF-5/r-BMPR-IA</b>	Human GDF-5 und human BMPR-IA
<b>r-GDF-5/r-BMPR-IB</b>	Human GDF-5 und human BMPR-IB



### 2.3 Betrachtungen zu den Verfahren der cDNA-Synthese und RT-PCR

Die Analyse spezifischer Genexpressionsmuster auf Ebene der mRNA respektive ihrer cDNA stellt das Gros dieser Arbeit dar. Es scheint daher angebracht, die hierbei eingesetzte Methodik der cDNA-Synthese und RT-PCR eingehender zu reflektieren.

Eukaryotische Zellen reagieren aufgrund der unterschiedlichsten Begebenheiten, wie beispielsweise Überexpression distinkter Gene, Proliferation, Differenzierung, Zelltod und vieles mehr, mit einer Änderung der Genexpression. Ziel ist es, die Expression spezifischer Gene zu verfolgen, um Modelle über die biologische „Maschinerie“, die dieser Änderung zugrunde liegt, entwickeln zu können. Eine verbreitete Methode stellt hierbei die Analyse der differierenden mRNA-Populationen mit Hilfe der RT-PCR (Polymerase-Kettenreaktion mit cDNA als Ausgangs-DNA) dar. Durch diese äußerst sensitive Methode können spezifische mRNAs respektive cDNAs aus der Gesamtpopulation amplifiziert und somit in Bezug auf ihre Expression in qualitativer, semi-quantitativer und auch quantitativer Weise verifiziert werden.

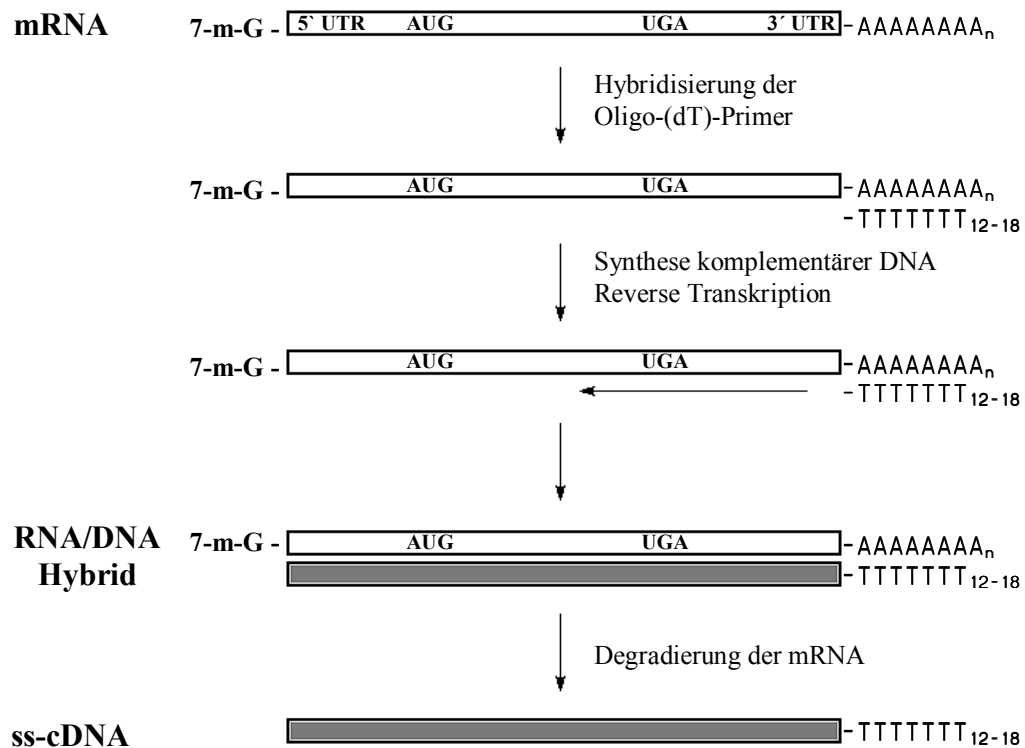


Abbildung 2.3.1: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der modulierten Expressionsprofile wurde zunächst die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Zellen isoliert (Kapitel 5.5.1). Um selektiv die mRNA, welche nur 1 bis 2% der Gesamt-RNA ausmacht, zu separieren, macht man sich die strukturellen Eigenschaften der mRNA zunutze, indem durch Verwendung von Oligo-d(T)-Oligonukleotiden während der cDNA-Synthese (Kapitel 5.5.3) nur RNA mit poly(A)-Schwanz in einzelsträngige cDNA revers transkribiert wird (Abbildung 2.3.1). Hierbei ist zu bedenken, daß die RNA-Isolierung keine vollständige ist. Desweiteren wird während der cDNA-Synthese nur ein bestimmter Teil der isolierten mRNA in cDNA revers transkribiert; eine 100%ige

Ausbeute kann nicht gewährleistet werden. Dieses ist besonders bei Detektion oder Verfolgung der Regulation sehr schwach exprimierter Gene zu bedenken.

Die so gewonnenen cDNAs dienen als Ausgangs-DNA für die anschließenden Analysen mittels der RT-PCR (Abbildung 2.3.2).

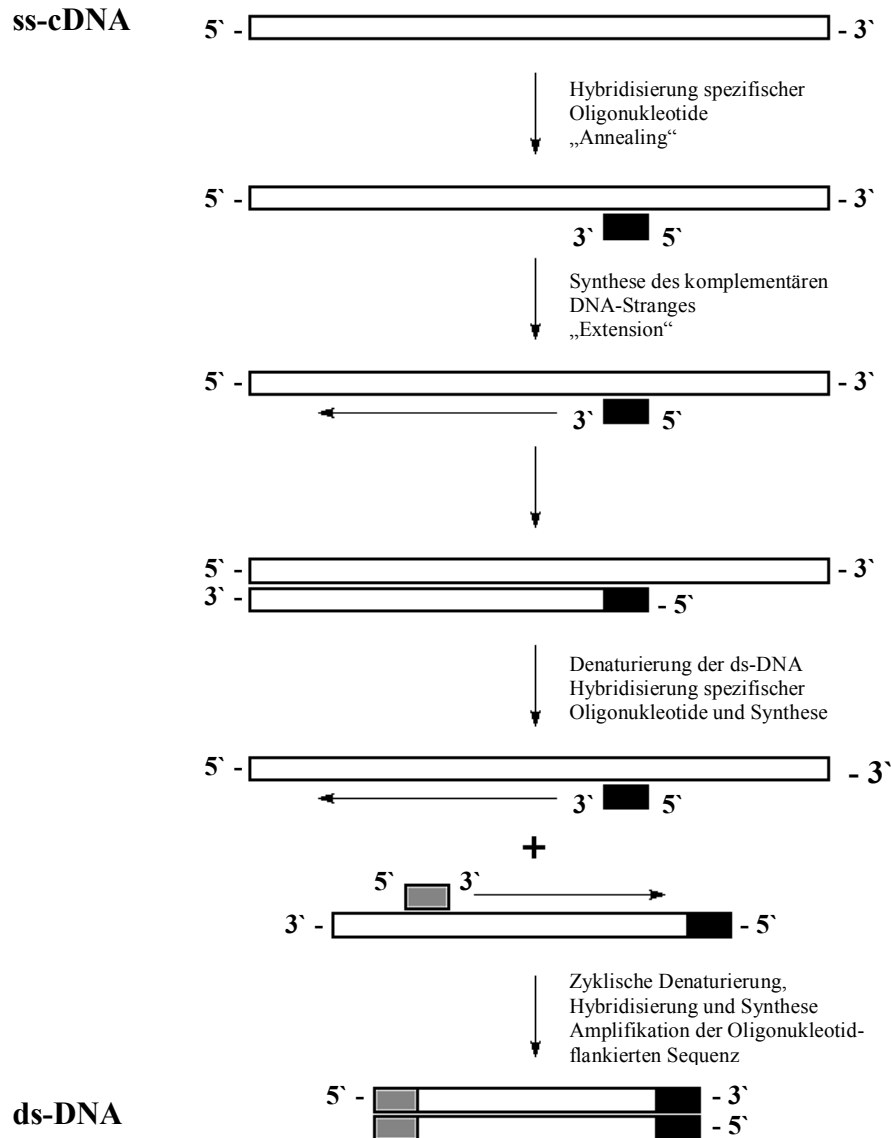


Abbildung 2.3.2: Schematische Darstellung der RT-PCR-Methode

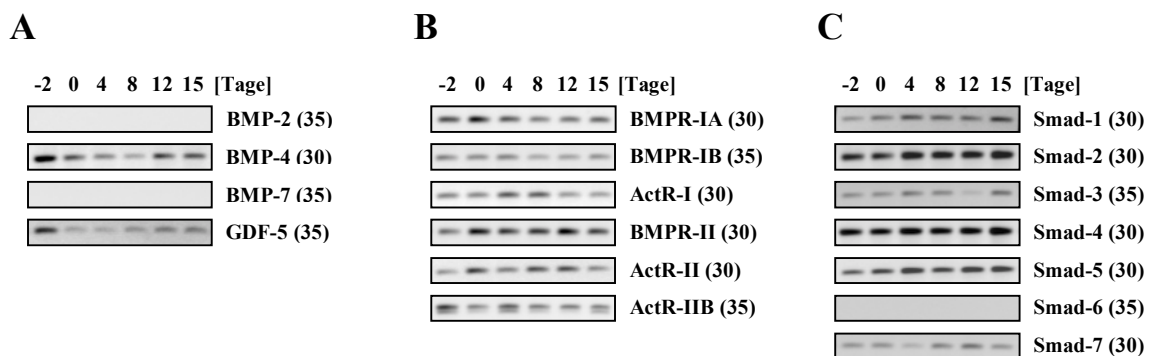
Zunächst werden für eine semi-quantitative RT-PCR-Analyse die einzelnen cDNA-Proben hinsichtlich ihrer Expression eines nicht-regulierten Haushaltsgens durch entsprechende Verdünnung der cDNAs und anschließender PCR-Reaktion abgeglichen, so daß in allen verwendeten cDNA-Proben eine gleiche Expressionshöhe detektiert wird. Die egalisierten cDNAs zeigen einen vergleichbaren revers transkribierten mRNA-Anteil, so daß unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide distinkte cDNAs amplifiziert und in Agarosegelen sichtbar gemacht werden können. Aufgrund der hohen Sensitivität der Methode ist es ein leichtes einzusehen, daß die Reaktion äußerst sensibel auf die eingesetzte Menge an cDNA und die Handhabung reagiert.

## 2.4 Differenzierungsstudien

### 2.4.1 Komponenten der *Bone Morphogenetic Protein* - Signalkaskade

Wie bereits im Kapitel 2.3 dargestellt, dienten fünfzehntägige Differenzierungskulturen zum Verifizieren des chondro-/osteogenen Potentials der etablierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zelllinien mit dem Ziel, die verantwortlichen BMP Typ I Rezeptoren der BMP-2-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung zu ermitteln. Hierzu wurden die entsprechenden Zelllinien in einer Dichte von 10.000 Zellen/cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausplattiert und bis zur Konfluenz kultiviert; nach dem Erreichen der zellulären Konfluenz wurde das Kulturmedium mit 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 50  $\mu$ g/ml Ascorbat substituiert, wobei das Kulturmedium alle zwei Tage zu dreiviertel ausgetauscht wurde. Zu den angegebenen Kulturzeitpunkten wurden Proben zur Isolierung der RNA mit anschließender cDNA-Synthese und zur histologischen Analyse aufgearbeitet.

Hinsichtlich der BMP-2-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und der daran beteiligten Rezeptoren wurde zunächst der Status der endogen exprimierten Signalmoleküle der Bone Morphogenetic Protein Signalkaskade bestimmt.



**Abbildung 2.4.1:** RT-PCR Analyse der endogenen Expression von Signalmolekülen der BMP-Signalkaskade in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (r-C3H10T $\frac{1}{2}$ )

- A) Expression von Bone Morphogenetic Proteins in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen
- B) Expression der korrespondierenden Rezeptoren in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen
- C) Expression der zytosolischen Smad-Signalmoleküle in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die zur Darstellung der inhärenten BMP-, BMP-Rezeptor- und Smad-Expression (siehe auch Kapitel 1.2 und 1.3) in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eingesetzten Oligonukleotide sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen; für die RT-PCR-Reaktion wurde 1  $\mu$ l der entsprechenden cDNA eingesetzt; die verwendete Zykluszahl ist in der Abbildung 2.4.1 in Klammern angegeben.

Laut Abbildung 2.4.1A konnte die endogene Expression der extrazellulären BMP-Rezeptor Liganden BMP-4 und GDF-5 nachgewiesen werden, wobei BMP-4 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen moderat und GDF-5 schwach über den gesamten Kulturzeitraum hinweg exprimiert wird. BMP-2 und BMP-7 hingegen konnten nicht detektiert werden.

Desweiteren konnte die Expression diverser BMP-bindender membranständiger Rezeptoren gezeigt werden (Abbildung 2.4.1.B), welche während der Kultur konstitutiv exprimiert werden. Hinsichtlich der BMP Typ I Rezeptoren wird BMPR-IB im Gegensatz zu BMPR-IA schwach exprimiert, wohingegen der BMP Typ II Rezeptor BMPR-II deutlich am stärksten exprimiert wird. Als weitere BMP-bindende Rezeptoren werden in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen Activin-Rezeptoren exprimiert. Hier zeigen der Activin Typ I Rezeptor ActR-I und der Activin Typ II

Rezeptor ActR-II eine moderate Expressionshöhe, während der Activin Typ II Rezeptor ActR-IIB schwach exprimiert wird. Der Activin Typ II Rezeptor ActR-IIB wird in vier Splice-Varianten exprimiert [Attisano, 1992], von denen zwei mit den hier verwendeten Oligonukleotiden (449 Bp: ActR-IIB<sub>1</sub>/ActR-IIB<sub>3</sub>; 425 Bp: ActR-IIB<sub>2</sub>/ActR-IIB<sub>4</sub>) nachgewiesen werden können.

In Abbildung 2.4.1C werden die Expressionsprofile der Smads als zytosolische Signalmoleküle der BMP-Signalkaskade aufgezeigt; hier werden Smad-2 und Smad-4 am stärksten exprimiert, gefolgt von Smad-5, Smad-1, Smad-7 und Smad-3 in abnehmender Expressionshöhe. Smad-6 konnte im gesamten Kulturzeitraum nicht detektiert werden. Im Hinblick auf die Expression von Smad-8 ist anzumerken, daß die murine Sequenz zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht publiziert war, wobei Smad-8 mit Konsensus-Oligonukleotiden aus homologen Bereichen mehrerer Spezies nicht nachgewiesen werden konnte.

Bezüglich der Komponenten der BMP-Signalkaskade konnten in den im Kapitel 2.2.4 aufgeführten Zelllinien keine signifikanten Änderungen der in Abbildung 2.4.1 dargestellten Expressionsprofile festgestellt werden. Somit stehen in allen hier untersuchten Linien endogen exprimierte Komponenten der BMP-Signalkaskade mit den Liganden BMP-4 und GDF-5, BMP-Rezeptoren, Activin-Rezeptoren und Smads als zytosolische Mediatoren zur Verfügung.

## **2.4.2 BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

Die Überexpression von rekombinantem humanem BMP-2 in der murinen Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  führt zur Ausbildung und Differenzierung distinkter mesenchymaler „Lineages“ oder auch Zellpopulationen, wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten [Ahrens, 1995]. In der Zellkultur kann die Ausprägung dieser Zellarten nach 15 tägiger Kultur unter Differenzierungsbedingungen anhand der Analyse des Expressionsverhaltens bestimmter Markergene der chondro-/osteogenen Entwicklung und korrespondierende histologische Färbungen verifiziert werden. Parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hingegen zeigen keine Entwicklung in eben jene mesenchymale Zelltypen; ohne entsprechenden äußeren Stimulus weisen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen einen normalen fibroblastoiden Phänotyp auf.

### **2.4.2.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

Die Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in die chondro-/osteogene Lineage geht mit der Regulation knochen- und knorpelspezifischer Gene einher, wobei eine deutliche Trennung der chondrogenen und osteogenen Differenzierung aufgrund der spatialen und temporären Expression dieser Gene in der endochondralen Ossifikation (Kapitel 1.4) sich oftmals als problematisch erweist.

In der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden die Genexpressionsmuster von Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Parathyroid hormone/Parathyroid hormone-related peptide-Rezeptor (PTH-/PTHrP-Rezeptor) und dem osteogenen Transkriptionsfaktor CBFA-1 als Markergene der osteogenen Differenzierung zugrunde gelegt. Als chondrogene Markergene dienen Kollagen Typ II, Kollagen Typ IX und Fibroblast Growth Factor Receptor-3 (FGFR-3). Eine Differenzierung in die adipogene Entwicklungsrichtung kann anhand der Regulation von adipozyten-spezifischen Genen wie adipocyte lipid-binding protein (aP-2) und adipoQ veranschaulicht werden. Weiterhin erweist sich Pex/PEX als putatives Markergen der chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.

#### 2.4.2.1.1 Expressionsprofil osteogener Markergene

In Osteoblasten-Zellkulturen werden während der Proliferationsphase eine Anzahl von Genen exprimiert, die Bestandteile der extrazellulären Matrix kodieren und somit deren Bildung ermöglichen. Zu diesen Matrixbestandteilen gehört das fibrilläre **Kollagen Typ I**. Dieses Protein besteht aus zwei  $\alpha 1(I)$ -Ketten und einer  $\alpha 2(I)$ -Kette und stellt die Hauptkomponente der organischen Knochenmatrix dar, wird aber auch in den meisten Bindegeweben wie Haut und Sehnen, nicht aber im Knorpelgewebe gefunden [Robey, 1989].

Der Hauptanteil der nicht-Kollagen Proteine (10-20%) in der Knochenmatrix wird von **Osteocalcin** als kleines  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure enthaltendes Protein gestellt, welches exklusiv im Knochen exprimiert wird [Carlson, 1993]. Die Regulation der Osteocalcin-Transkription ist von verschiedenen Faktoren, wie Vitamin A- und D - Rezeptoren und dem jun-fos-Komplex AP-1 abhängig [Schüle, 1990]. In einer Osteoblastenkultur wird dieses Matrixprotein erst in der Mineralisierungsphase exprimiert und stellt ein hochspezifisches Markergen der Knochenbildung dar [Hauschka, 1986].

Neben Osteocalcin wird in einer Osteoblastenkultur in der Phase der extrazellulären Matrix-entwicklung und -reifung die Expression von **Osteopontin** induziert. Osteopontin ist ein glykosyliertes multifunktionelles Phosphoprotein, welches sezerniert wird. Es stellt einen wesentlichen Bestandteil der extrazellulären Matrix von Osteoblasten dar [Mark, 1987], wird aber auch bei Osteoklasten, Chondrozyten und Fibroblasten gefunden. Die Expression von Osteopontin ist gewebespezifisch und wird von den verschiedensten Hormonen und Wachstumsfaktoren reguliert [Denhardt, 1993].

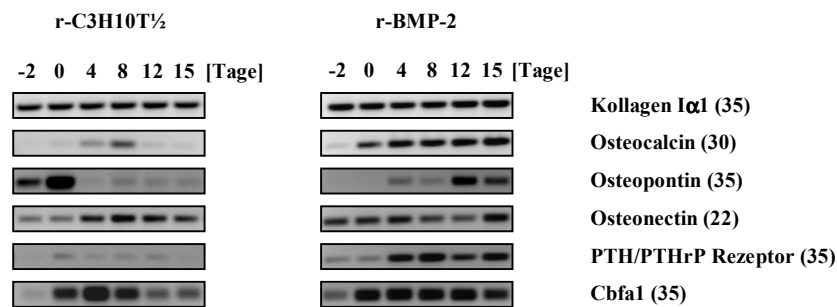
Desweiteren ist **Osteonectin** als saures Phosphoprotein in erhöhtem Maße in der Knochenmatrix zu detektieren [Termine, 1981]. Osteonectin wird aber auch in weitaus geringerem Maße von Chondrozyten exprimiert [Chandrasekhar, 1994].

Der **PTH-/PTHrP-Rezeptor** ist ein G-Protein gekoppelter Zelloberflächenrezeptor, welcher sieben Transmembrandomänen aufweist [Jüppner, 1991]. Als Liganden gelten das von der Nebenschilddrüse sekretierte Parathyroidhormon und sein parakrines Analog PTHrP [Kronenberg, 1997]. Parathyroidhormon stellt bei Säugetieren den Hauptregulator des Kalziumhaushalts dar. Nach Bindung des Hormons an den Oberflächenrezeptor erfolgt die Aktivierung diverser „second messenger“ Signalmoleküle, die zytoplasmatisch die vielfältigen PTH-Effekte vermitteln. Der PTH-/PTHrP-Rezeptor wird in beträchtlichen Mengen von der Niere und den Knochen als Zielorgane des Parathyroidhormons exprimiert [Ureña, 1993].

Homozygote Null-Mutationen von PTHrP sterben postnatal, welches auf ausgedehnte Abnormalitäten der endochondralen Knochen zurückzuführen ist [Karaplis, 1994]. Eine reduzierte Proliferation, beschleunigte Differenzierung und frühzeitige Apoptose von Chondrozyten führt während der endochondralen Ossifikation zur schnellen und zeitlich ungerichteten Reifung des Skeletts [Karaplis, 1998]. Im Gegensatz hierzu führen zielgerichtete Überexpressionen von PTHrP oder Expression von konstitutiv aktivem PTH-/PTHrP-Rezeptor während der Embryonalentwicklung zu einer Verzögerung der endochondralen Ossifikation, welches sich in neugeborenen Mäusen durch knorpelige Skelettstrukturen manifestiert [Weir, 1996; Schipani, 1997]. PTHrP und PTH-/PTHrP-Rezeptor scheinen als Inhibitoren der Differenzierung von Chondrozyten während der endochondralen Ossifikation eine entscheidende Rolle zu spielen.

**Cbfa1** oder auch *Pebpα2A* (*polyoma enhancer-binding protein*) gehört zur Familie der heterodimeren CBF (*core-binding factor*) Transkriptionsfaktoren, deren α-Untereinheit zur DNA-Bindung (runt-Domäne) in Säugern von drei distinkten Genen (Cbfa1, Cbfa2 und Cbfa3) und deren gemeinsame β-Untereinheit vom Cbfb-Gen kodiert wird [Speck, 1995; Ito, 1996]. Cbfa1 interagiert mit dem *osteoblast-specific cis-acting element* (OSE2) des Osteocalcin-Promotors, ist BMP-7 und Vitamin D<sub>3</sub> reguliert und fungiert als osteoblastenspezifischer Transkriptionsfaktor in der Osteoblastendifferenzierung [Ducy, 1997]. Im Mausmodell führen Null Mutationen von Cbfa1 zu einem vollständigen Verlust der Knochenbildung während der Embryonalentwicklung, welches auf ein Arretieren der Osteoblastenreifung zurückzuführen ist [Komori, 1997; Otto, 1997]. Desweiteren sind Mutationen in Cbfa1 mit der humanen Störung der Skelettentwicklung Cleidocranial Dysplasia (CCD), welche durch gestörte endochondrale und intramembranöse Knochenbildung gekennzeichnet ist, assoziiert [Mundlos, 1997].

In C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt die transiente oder stabile Expression von Cbfa1 und seinen Isoformen zur Induktion von spezifischen osteogenen Markergenen wie beispielsweise Alkalische Phosphatase, Osteocalcin und Kollagen Typ I [Harada, 1999].



**Abbildung 2.4.2:** Expressionsprofile osteogener Markergene in BMP-2 abhängiger chondro-/osteogener Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1μl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Durch Überexpression von rekombinantem BMP-2 wird in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen unter den hier verwendeten Differenzierungsbedingungen laut Abbildung 2.4.2 eine Reihe distinkter osteogener Markergene reguliert. Im Vergleich zu parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen die Expression von Osteocalcin, Osteopontin und dem PTH/PTHrP-Rezeptor induziert. Die Expression von Kollagen Iα1 und Osteonectin wird nicht reguliert. Auch der osteogene Transkriptionsfaktor Cbfa-1 wird durch die rekombinante Expression von BMP-2 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nur wenig reguliert; obwohl eine Erhöhung der Expression in später Kulturphase beobachtet werden kann, ist eine deutliche Induktion von Cbfa-1 nicht gegeben. Im Hinblick auf die Expressionsstärke wird Osteonectin sehr stark, Osteocalcin moderat und Kollagen Iα1, Osteopontin, PTH/PTHrP-Rezeptor und Cbfa1 eher schwächer in BMP-2 transfizierten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen exprimiert.

### 2.4.2.1.2 Expressionsprofil chondrogener Markergene

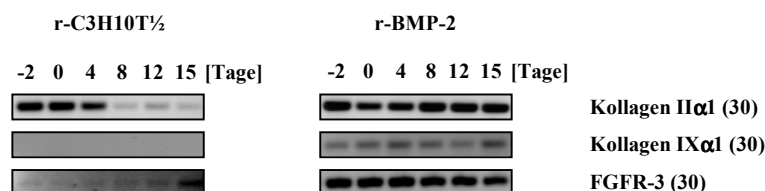
Im nativen Knorpel sind Chondrozyten in einer ausgeprägten extrazellulären Matrix eingebettet, wobei der Anteil an Chondrozyten nur zirka 2% des gesamten Knorpelvolumens beträgt [Stockwell, 1967]. Die Knorpelmatrix besteht zu einem Großteil aus einem Netzwerk von Kollagenen, Proteoglykanen und Hyaluronsäure [Cancedda, 1995], wobei das **Kollagen Typ II**, ein Homotrimer aus drei  $\alpha 1(\text{II})$ -Ketten, den weitaus größten Anteil der Matrixkollagene einnimmt [Robey, 1989]. Während der Knorpeldifferenzierung kann Kollagen Typ II während der Phase der mesenchymalen Kondensierung detektiert werden [Kosher, 1986], wobei die Expression im Proliferations-, Reifungs- und oberen hypertrophen Bereich der Wachstumszone („*growth plate*“) bestehen bleibt [Sandberg, 1987].

Das extrazelluläre Netzwerk der knorpeligen Kollagenstrukturen zeigt eine kovalente Bindung von Kollagen Typ II Fibrillen mit **Kollagen Typ IX** [Eyre, 1987]. Kollagen Typ IX ist ein heterotrimeres Molekül, welches aus drei genetisch distinkten Polypeptidketten ( $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\alpha 3$ -Kette) besteht [van der Rest, 1987]. Transgene Mäuse, welche eine *in-frame* Deletion großer Bereiche der Kollagen IX $\alpha 1$ -Kette aufweisen, entwickeln einen Phänotyp ähnlich der humanen Osteoarthritis und der milden Form von Chondrodysplasie [Nakata, 1993]. Null Mutationen der Kollagen IX $\alpha 1$ -Kette zeigen keinen augenscheinlichen Effekt hinsichtlich der Skelettentwicklung. Kollagen Typ IX scheint nicht essentiell oder aber funktionell redundant in der *in vivo* Knorpelentwicklung zu sein [Hagg, 1997], wobei in der embryonalen Skelettentwicklung Kollagen Typ IX im unreifen Knorpel, so auch in endochondralen Ossifikationszentren exprimiert wird [Mayne, 1996].

Fibroblast Growth Factor Receptor 3 (**FGFR-3**) gehört zur Klasse von vier membranständigen Tyrosin-Kinasen, die als hochaffine Rezeptoren für wenigstens siebzehn Fibroblast Growth Factors (FGFs) dienen [Basilico, 1992; Goldfarb, 1996].

Während der embryonalen Knochenentwicklung wird FGFR-3 in proliferierenden und ruhenden, aber nicht in hypertrophen Chondrozyten der Epiphysen-Wachstumszone exprimiert [Peters, 1993; Deng, 1996]. Null Mutationen des FGFR-3 zeigen normale Ossifikationszentren, eine Ausweitung der Zone hypertropher Chondrozyten und ein verstärktes Knochenwachstum [Colvin, 1996]. Punktmutationen in der Transmembranregion (G380R) führen zu einer permanenten Aktivierung von FGFR-3, welches im Mausmodell, vergleichbar mit der humanen Störung der Skelettentwicklung Achondroplasie, zu Zwergenwuchs mit verkleinerten Wachstumszonen der Rippen, Wirbel und Röhrenknochen führt [Wang, 1999].

Durch Regulation des Übergangs von Chondrozyten in den hypertrophen Status und Inhibition der Chondrozytenproliferation mag FGFR-3 als negativer Regulator der Knochenentwicklung fungieren.



**Abbildung 2.4.3:** Expressionsprofile chondrogener Markergene in BMP-2 abhängiger chondro-/osteogener Differenzierung von C3H10T1/2-Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogenen Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Laut Abbildung 2.4.3 werden in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen die chondrogenen Markergene Kollagen II $\alpha$ 1, Kollagen IX $\alpha$ 1 und FGFR-3 eindeutig induziert. In den parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird Kollagen II $\alpha$ 1 während der Proliferationsphase bis zum Tag 4 der Kultur moderat exprimiert, um in der weiteren Kultur reprimiert zu werden. BMP-2 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen über den gesamten Kulturzeitraum eine moderate Expression an Kollagen II $\alpha$ 1. Kollagen IX $\alpha$ 1 kann in parentalen Zellen nicht detektiert werden und wird durch BMP-2 induziert. Die Expressionsstärke von FGFR-3 nimmt im Laufe der Kultur in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen leicht zu und zeigt in BMP-2 transfizierten Zellen eine deutliche Induktion.

#### 2.4.2.1.3 Expressionsprofil adipogener Markergene und Pex-Expression

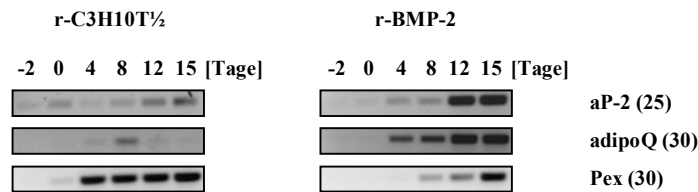
Das Fettgewebe spielt eine wichtige Rolle im Fettsäuremetabolismus, in der Glukose-Homeostase und als Energiespeicher. Adipozyten synthetisieren und speichern Triglyceride in Zeiten von Nahrungsüberschuß, welche bei Hunger wiederum mobilisiert werden [Spiegelman, 1993]. Auf molekularer Ebene werden viele Gene, die im Fettsäuremetabolismus und in der Glukose-Homeostase involviert sind, hauptsächlich im Fettgewebe exprimiert [Cornelius, 1994]. Hierzu zählen unter anderen Fettsäuresynthetasen, fatty-acid binding protein aP-2 und Lipoprotein Lipasen [Moustaid, 1991; Hunt, 1986; Cornelius, 1988]. Das **aP-2** Gen kodiert das intrazelluläre „*adipocyte lipid-binding protein*“, welches als Lipide bindendes Protein „*fat carrier*“ eine entscheidende Rolle im Fettzell-Metabolismus und in der Adipogenese spielt [Yang, 1989]. Während der Adipozyten-Differenzierung von 3T3-L1-Prä-adipozyten wird aP-2 in späten Phasen der Differenzierung exprimiert; dieses Expressionsmuster findet sich auch bei **adipoQ**, einem sekretorischen Polypeptid von 247 AS. **adipoQ** wird spezifisch im Fettgewebe von Maus und Ratte exprimiert, wobei exklusiv reife Fettzellen eine Expression von **adipoQ** aufweisen [Hu, 1996].

Patienten mit X-Chromosom gekoppelter Hypophosphatämie (XLH) zeigen eine Störung der Phosphathomeostase, welche sich in Wachstumsstörungen, Rachitis, Knochendeformationen und Hypophosphatämie manifestiert und auf Mutationen im **Pex**-Gen (*phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*) zurückzuführen sind [HYP Consortium, 1995]. Pex kodiert ein integrales Typ II Membranprotein mit strukturellen Homologien zu neutralen Endopeptidasen und wird sowohl prädominant in fötalen und adulten Kalvarien und Röhrenknochen des Menschen und der Maus [Beck, 1997] als auch von Osteoblasten in intramembranösen/endochondralen Ossifikationszentren und Odontoblasten der Maus exprimiert [Ruchon, 1998].

Im Mausmodell (Hyp- und Gy-Maus) führen Deletionen im Pex-Gen zu einem ähnlichen XLH-Phänotyp [Strom, 1997]; Osteoblastenkulturen der Hyp-Maus weisen eine verringerte Kalziumeinlagerung in der extrazellulären Matrix und eine Reduktion an Mineralisierungszonen auf [Xiao, 1998]. Transiente Expressionsstudien in COS-Zellen konnten erste funktionelle Eigenschaften von Pex als Parathyroidhormon (PTH) spaltende Endopeptidase aufzeigen [Lipman, 1998].

Pex mag hier erstmalig als neues putatives Markergen der chondro-/osteogenen Differenzierung mesenchymaler Zellen beschrieben werden.





**Abbildung 2.4.4:** Expressionsprofile adipogener Markergene und Pex-Expression in BMP-2 abhängiger chondro-/osteogener Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene und Pex sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

In C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden die adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ im gesamten Kulturzeitraum schwach exprimiert und zeigen durch Expression von rekombinantem BMP-2 eine deutliche Induktion ab Tag 4 nach Erreichen zellulärer Konfluenz (Abbildung 2.4.4). Das Expressionsmuster von Pex hingegen weist in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ab Tag 4 nach Konfluenz eine hohe Expression an Pex auf, welche durch Überexpression von BMP-2 eindeutig reprimiert wird; eine ähnliche Expressionsstärke wie in den parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird in der BMP-2 exprimierenden Kultur erst am Tag 15 der Kultur erreicht.

Die Überexpression von rekombinantem BMP-2 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt unter Differenzierungsbedingungen auf Ebene transkribierter mRNA zur Induktion distinkter osteogener, chondrogener und adipogener Markergene.

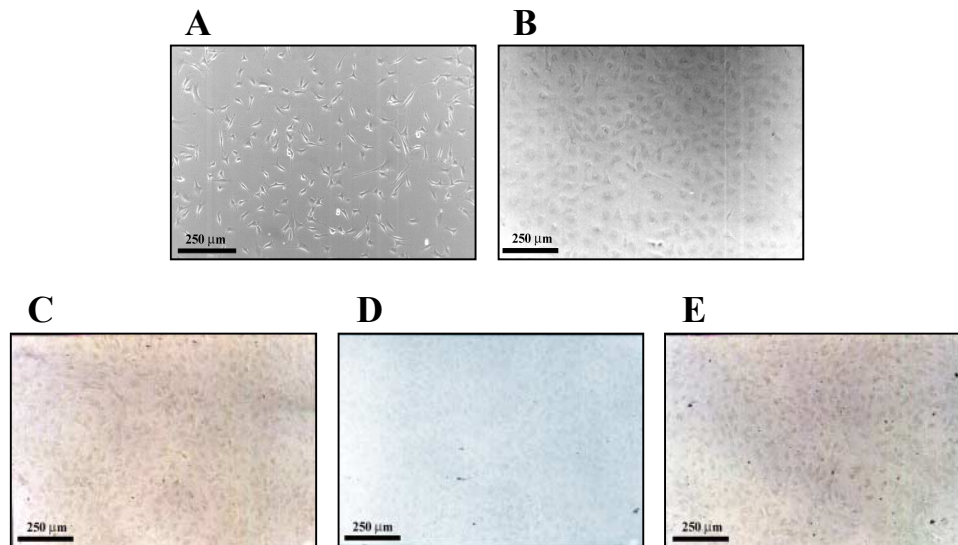
#### 2.4.2.2 Morphologie und histologische Färbungen zur BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

##### 2.4.2.2.1 Morphologie und histologische Färbungen parentaler C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (r-C3H10T $\frac{1}{2}$ ) wachsen einschichtig im „*Monolayer*“ und weisen eine typische langgestreckte fibroblastoide Morphologie auf. Während der Proliferationsphase strecken sich die Zellen und bilden vielfältige Ausläufer (Abbildung 2.4.5A). Nach dem Erreichen zellulärer Konfluenz (Abbildung 2.4.5B) erscheinen sie dicht gepackt mit ausgeprägten Zell-Zell-Kontakten. Nach weiteren 5 bis 6 Tagen unter Differenzierungsbedingungen wird ein Absterben von Zellen beobachtet, welches mit der Wandlung der Zellgestalt in eine kompakte, gedrungene Form einhergeht.

C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wohnt das Potential inne, sich in verschiedene Differenzierungsrichtungen zu entwickeln. So ist die Differenzierung zu Osteoblasten gekennzeichnet durch die Expression knochenspezifischer Markergene wie zum Beispiel der Alkalischen Phosphatase [Owen, 1990]. Zelluläre Alkalische Phosphatase kann histologisch durch Alkalische Phosphatase-Färbung (Kapitel 5.2.7.4) aufgezeigt werden und liefert einen Hinweis auf die Ausprägung osteoblastoider Zelltypen, wobei Alkalische Phosphatase in geringerem Maß auch von Chondrozyten exprimiert wird.

Zur Darstellung von Kalziumablagerungen in osteoblastoiden Mineralisierungszonen wird die von Kossa-Färbung verwendet (Kapitel 5.4.7.5); Mineralisierung kann auch bei Chondrozyten in schwächerer Ausprägung beobachtet werden. Desweiteren kann durch Färbung mit Alcian Blau, welches für Knorpel typische saure Proteoglykane färbt, die chondrogene Entwicklungslinie angezeigt werden (Kapitel 5.2.7.2). Adipozyten sind mittels der Oil Red O-Färbung (Kapitel 5.2.7.3), welche auf Anreicherung von Sudan III in den neutralen Lipidvesikeln beruht, in der Kultur nachzuweisen. Adipozyten können auch leicht lichtmikroskopisch anhand ihres charakteristischen Phänotyps ausgemacht werden; sie weisen viele Lipidtröpfchen auf, die eine differierende Lichtbrechung aufweisen.



**Abbildung 2.4.5:** Morphologie und histologische Färbungen parentaler C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

- |  |   |
|--|---|
| A r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag -2, PhaKo | D r- C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, Alcian    |
| B r- C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 0, PhaKo | E r- C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, von Kossa |
| C r- C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, ALP  |   |

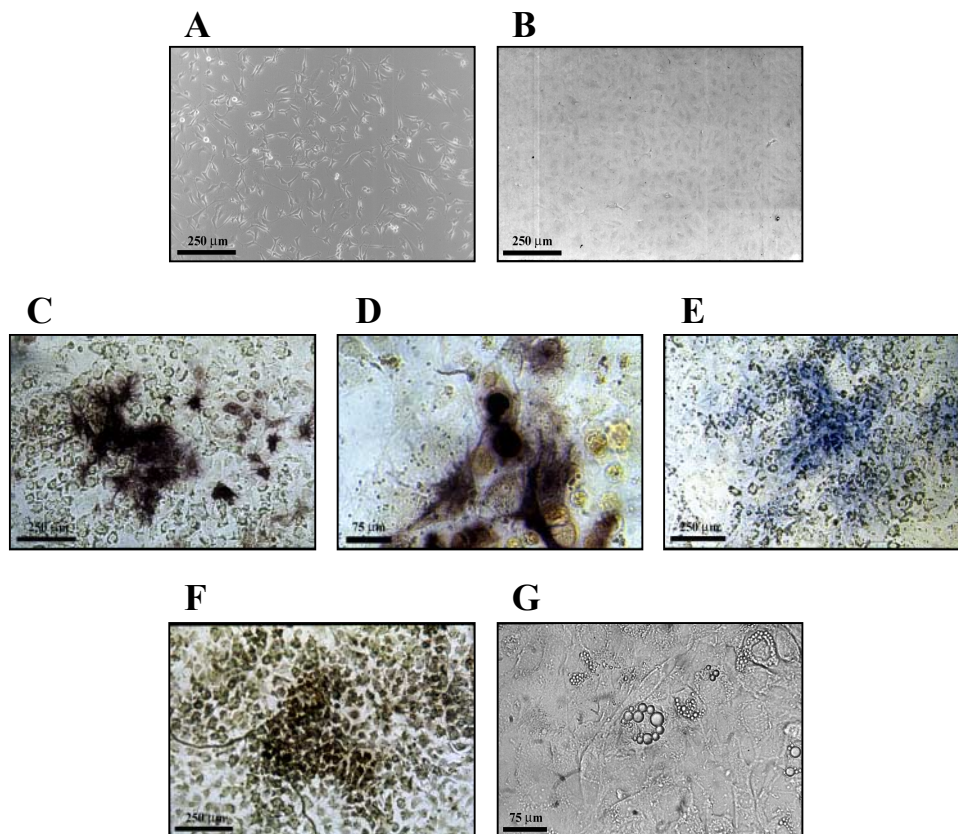
Die Kontrollzelllinie (r- C3H10T $\frac{1}{2}$ ) zeigt unter Differenzierungsbedingungen das typische Erscheinungsbild fibroblastoider Zellen (Abbildung 2.4.5A/B). Nach fünfzehntägiger Kultur kann die Expression interner Alkalischer Phosphatase, die Bildung von Proteoglykanen oder die Einlagerung von Kalzium in Mineralisierungszonen durch die entsprechenden Färbetechniken nicht angezeigt werden (Abbildung 2.4.5C-E). Die Ausbildung von Adipozyten kann weder lichtmikroskopisch noch durch Oil Red O-Färbung beobachtet werden.

Morphologisch und histologisch zeigen parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen einen normalen fibroblastoiden Phänotyp und weisen keine Differenzierung in die chondro-/osteogene Entwicklungsrichtung auf. Demgegenüber kann anhand histologischer Färbungen (Kapitel 2.4.2.2.2) und der Regulation spezifischer Markergene eine eindeutige Differenzierung BMP-2 exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in die chondro-/osteogene Entwicklungsrichtung festgestellt werden.

#### 2.4.2.2.2 Morphologie und histologische Färbungen BMP-2 exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

BMP-2 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen während der Proliferation ein typisches fibroblastoides Erscheinungsbild (Abbildung 2.4.6A), stellen aber ihre Teilungsaktivität mit dem Erreichen der zellulären Konfluenz (Abbildung 2.4.6B) nicht ein; r-BMP-2 Zellen wachsen mehrschichtig als „Multilayer“. Im Laufe der Kultur stellt sich die Morphologie der Zellen im Gegensatz zu parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen als sehr heterogen dar.

Unter Differenzierungsbedingungen können vereinzelt und gruppiert Alkalische Phosphatase-positive Zellen ausgemacht werden (Abbildung 2.4.6C), die sowohl eine typische osteoblastoide Morphologie mit stellaren Zelltypen als auch chondrogenen Charakter mit kugeligiger Gestalt zeigen (Abbildung 2.4.6D). Durch die Anfärbung mit Alcian Blau (Abbildung 2.4.6E) können Bereiche, angereichert mit Proteoglykanen, als chondrogene Matrix dargestellt werden. Das mit der osteogenen Differenzierung einhergehende Auftreten distinkter Mineralisierungszonen stellt sich vereinzelt durch Anfärbung eingelagerten Kalziums dar (Abbildung 2.4.6F). Lichtmikroskopisch können eine Vielzahl an Lipidtröpfchen beinhaltende Adipozyten beobachtet werden (Abbildung 2.4.6G).



**Abbildung 2.4.6:** Morphologie und histologische Färbungen BMP-2 exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

- |                          |                                      |
|--------------------------|--------------------------------------|
| A r-BMP-2, Tag -2, PhaKo | E r-BMP-2, Tag 15, Alcian            |
| B r-BMP-2, Tag 0, PhaKo  | F r-BMP-2, Tag 15, von Kossa         |
| C r-BMP-2, Tag 15, ALP   | G r-BMP-2, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |
| D r-BMP-2, Tag 15, ALP   |                                      |

### 2.4.3 Einfluß von BMP Typ I Rezeptoren auf die BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

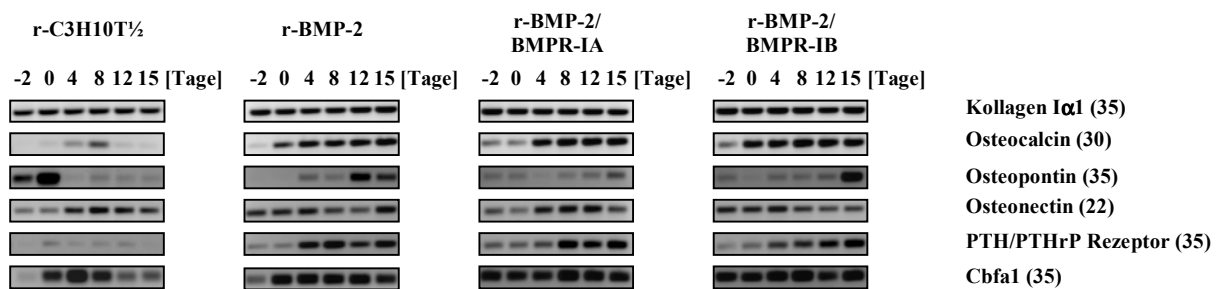
Wie bereits in Kapitel 2.4.2 dargelegt, führt die Überexpression von rekombinantem humanem BMP-2 in der murinen Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  zur Ausbildung und Differenzierung distinkter mesenchymaler Zelltypen wie Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten.

Zur Klärung der Rolle der BMP Typ I Rezeptoren (BMPR-IA und BMPR-IB) in der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurden hier die Zelllinien, welche neben BMP-2 die BMP Typ I Rezeptoren als funktionelle Versionen exprimieren, in entsprechenden Differenzierungskulturen bezüglich ihrer Expression chondro-/osteogener und adipogener Markergene sowie in histologischer Hinsicht betrachtet.

#### 2.4.3.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMP-2 und BMPR-I exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

##### 2.4.3.1.1 Expressionsprofil osteogener Markergene

Im Vergleich mit BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird die Expression osteogener Markergene in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die rekombinant BMP-2 und die entsprechenden funktionellen BMP Typ I Rezeptoren exprimieren, nur marginal reguliert (Abbildung 2.4.7).



**Abbildung 2.4.7:** Einfluß von BMP Typ I Rezeptoren auf die Expression osteogener Markergene in der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

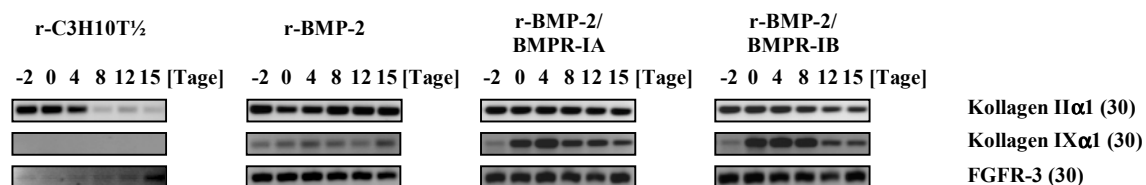
Kollagen Typ I zeigt in den BMP-2, BMP-2/BMPR-IA und BMP-2/BMPR-IB exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine vergleichbare Expressionshöhe. Osteocalcin wird durch Expression von BMPR-IA in den BMP-2 exprimierenden Zellen im Vergleich mit r-BMP-2 schwach induziert, zeigt aber während der Proliferationsphase (Tag -2 und Tag 0) eine verringerte Expression. Demgegenüber steht eine Induktion der Expression von Osteocalcin in den BMP-2 und BMPR-IB exprimierenden Zellen. Osteopontin und Osteonectin werden in den Doppeltransfektanten reprimiert; Osteopontin wird über den gesamten Kulturzeitraum schwach exprimiert, zeigt aber eine Repression während der proliferativen Phase und eine Induktion in sehr später Kultur (Tag 15) in den BMP-2 und BMPR-IB exprimierenden Zellen. Osteonectin weist in der BMP-2/BMPR-IA Kultur ein ähnliches Expressionsprofil wie in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen auf, wird aber verstärkt exprimiert. Die BMP-2/BMPR-IB Kultur hingegen zeigt in der Proliferationsphase bis zum Tag 4 der Kultur eine induzierte Expression an

Osteonectin, welche nachfolgend in ihrer Expressionshöhe abnimmt. Das Regulationsmuster der Typ I Rezeptor Doppeltransfektanten ist im Hinblick auf die Expression von PTH/PTHrP-Rezeptor und Cbfa-1 vergleichbar mit BMP-2 exprimierenden Zellen, wobei die Expression von Cbfa-1 während der Proliferation in den BMP-2 und BMPR-I exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen induziert wird.

Die Überexpression von funktionellen BMP Typ I Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt im Vergleich mit BMP-2 exprimierenden Zellen zu einer schwachen Induktion der osteogenen Differenzierung.

#### 2.4.3.1.2 Expressionsprofil chondrogener Markergene

Die Überexpression von BMP Typ I Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt im Vergleich mit den BMP-2 exprimierenden Zellen zu einer Induktion der chondrogenen Differenzierung (Abbildung 2.4.8).



**Abbildung 2.4.8:** Einfluß von BMP Typ I Rezeptoren auf die Expression chondrogener Markergene in der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Die Expression von Kollagen Typ II wird im Vergleich mit den BMP-2 exprimierenden Zellen durch die Überexpression von BMP Typ IB Rezeptoren reprimiert, zeigt aber über den gesamten Kulturzeitraum hinweg eine hohe Expression. Kollagen Typ IX wird durch die zusätzliche Expression der BMP Typ I Rezeptoren deutlich induziert. Die Expression von FGFR-3 wird ebenfalls durch Typ I Rezeptoren induziert, zeigt aber nur eine marginale Erhöhung der Expressionstärke.

Die Überexpression von funktionellen BMP Typ IA Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt im Vergleich mit BMP-2 exprimierenden Zellen zu einer Induktion der chondrogenen Differenzierung. BMP Typ IB Rezeptoren zeigen ebenfalls eine Induktion chondrogener Markergene, die aber aufgrund der Repression der Kollagen Typ II Expression als schwächer einzustufen ist.

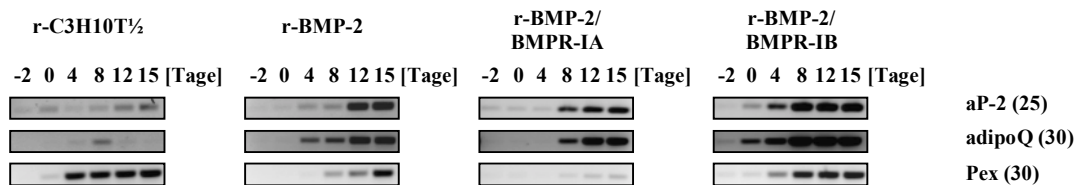
#### 2.4.3.1.3 Expressionsprofil adipogener Markergene und Pex-Expression

Laut Abbildung 2.4.9 wird die adipogene Differenzierung durch Expression von BMP Typ IB Rezeptoren deutlich induziert, während eine Überexpression von BMPR-IA eher eine Repression adipogener Markergene zur Folge hat. BMP-2 und BMPR-IB exprimierende Zellen zeigen eine frühere und stärkere Expression der adipogenen Markergene aP-2 und adipQ. BMP-2 und BMPR-IA exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen weisen zwar eine verfrühte



Expression an aP-2 auf, wobei die Expressionshöhe allerdings eine geringere ist; adipoQ wird erst zu einem späteren Kulturzeitpunkt induziert.

Die Reduktion der Pex-Expression in BMP-2 exprimierenden Zellen wird durch die Überexpression von BMPR-IA deutlich gefördert, während die Expression von BMPR-IB wiederum zu einer Erhöhung der Pex-Expression führt.



**Abbildung 2.4.9:** Einfluß von BMP Typ I Rezeptoren auf die Expression adipogener Markergene in der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Die Expression von BMPR-IB fördert die Differenzierung von BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ - Zellen in die adipogene Richtung, während diese bei Expression von BMPR-IA in schwächerer Ausprägung beobachtet wird.

#### 2.4.3.2 Histologische Färbungen zur BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung in BMP-2/BMPR-I exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Nach 15tägiger Kultur unter Differenzierungsbedingungen zeigen BMPR-IA und BMP-2 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen im Vergleich zu BMP-2 exprimierenden Zellen eine gesteigerte Aktivität an Alkalischer Phosphatase (Abbildung 2.4.10B/G), wobei morphologisch eher eine Zunahme an runden, chondroiden Zellen zu beobachten ist. Auch BMPR-IB und BMP-2 exprimierende Zellen zeigen eine leicht erhöhte Anzahl von Alkalische Phosphatase exprimierenden Zellen (Abbildung 2.4.10L), die morphologisch sowohl einen stellaren als auch einen runden, kugeligen Phänotyp aufweisen.

Die Anfärbung chondrogener Matrix durch Alcian Blau zeigt eine deutlich gesteigerte Matrixbildung der BMP-2 und BMPR-IA exprimierenden Zellen (Abbildung 2.4.10H), während die durch Alcian Blau anfärbbare Matrix in den BMP-2 und BMPR-IB exprimierenden Kulturen im Vergleich zu BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eher schwächer ausgeprägt ist (Abbildung 2.4.10C/M).

Die Anfärbung von Mineralisierungszonen durch die von Kossa-Färbung zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den BMP-2 und den BMP-2 und BMP Typ I Rezeptoren exprimierenden Zellen (Abbildung 2.4.10D/I/N).

Die Ausbildung von Adipozyten in den BMP-2 und BMP-2/BMPR-IA Kulturen erweist sich als vergleichbar, während die Expression von BMP-2 und BMPR-IB zu einer Zunahme an Adipozyten in der Kultur führt (Abbildung 2.4.10E/J/O).

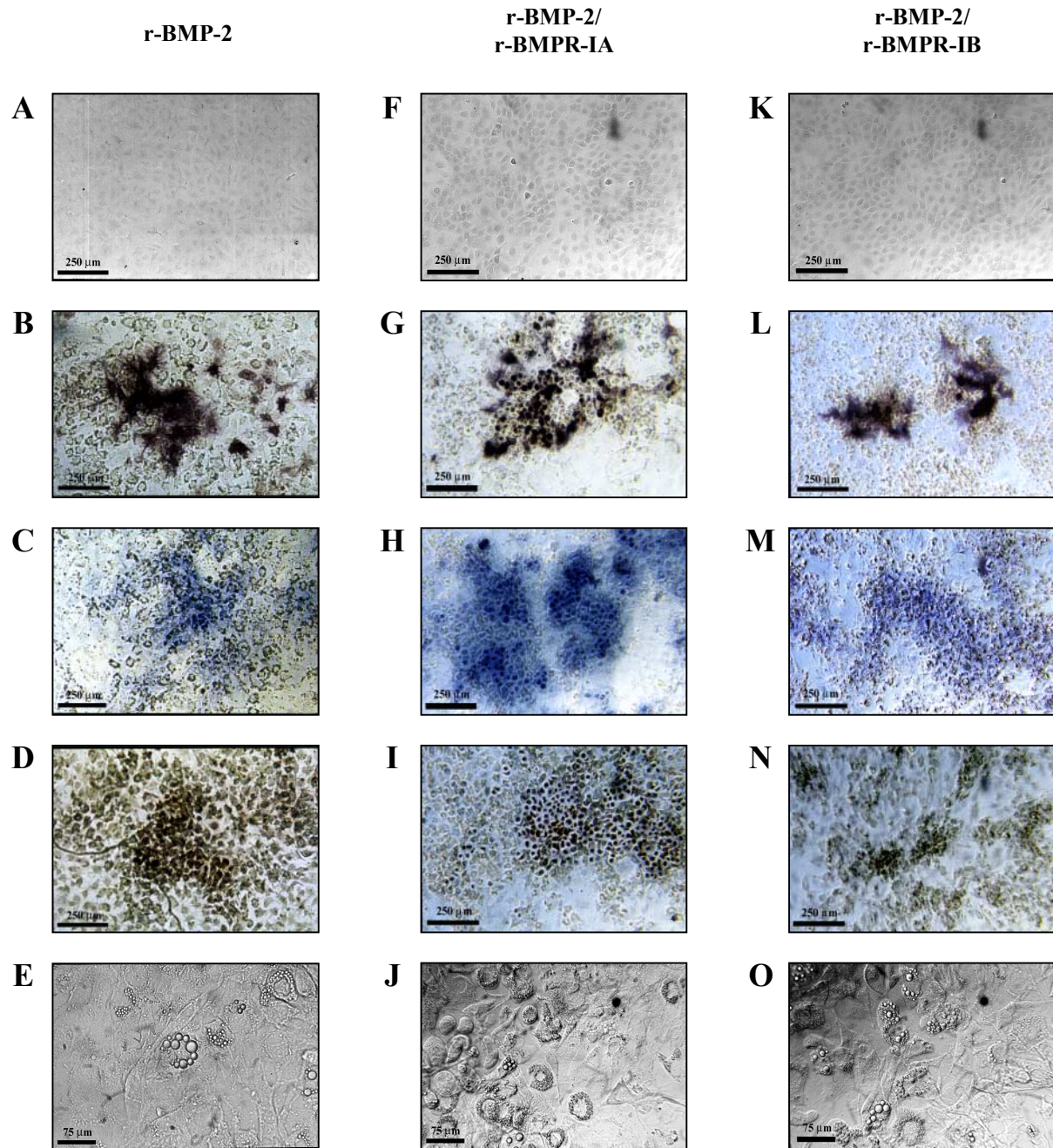
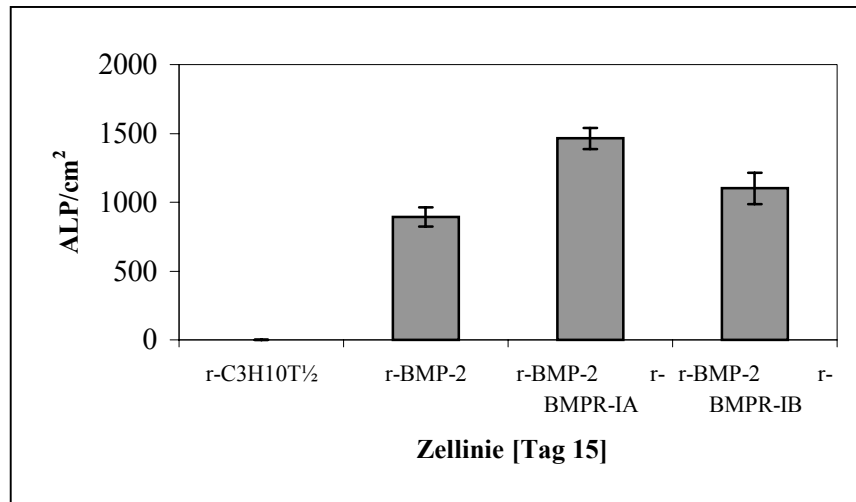


Abbildung 2.4.10: Morphologie und histologische Färbungen

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| A r-BMP-2, Tag 0, PhaKo              | I r-BMP-2/r-BMPR-IA, Tag 15, von Kossa         |
| B r-BMP-2, Tag 15, ALP               | J r-BMP-2/r-BMPR-IA, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |
| C r-BMP-2, Tag 15, Alcian            | K r-BMP-2/r-BMPR-IB, Tag 0, PhaKo              |
| D r-BMP-2, Tag 15, von Kossa         | L r-BMP-2/r-BMPR-IB, Tag 15, ALP               |
| E r-BMP-2, Tag 15, Adipozyten, PhaKo | M r-BMP-2/r-BMPR-IB, Tag 15, Alcian            |
| F r-BMP-2/r-BMPR-IA, Tag 0, PhaKo    | N r-BMP-2/r-BMPR-IB, Tag 15, von Kossa         |
| G r-BMP-2/r-BMPR-IA, Tag 15, ALP     | O r-BMP-2/r-BMPR-IB, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |
| H r-BMP-2/r-BMPR-IA, Tag 15, Alcian  |  |



**Abbildung 2.4.11:** Alkalische Phosphatase-positive Zellen in BMP-2 und BMP-2/BMPR-I exprimierenden C3H10T½-Zellen

Die Bestimmung der Anzahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen erfolgte über dreimaliges Auszählen der jeweiligen Kulturen. Dargestellt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen im Mittel und die korrespondierende Standardabweichung.

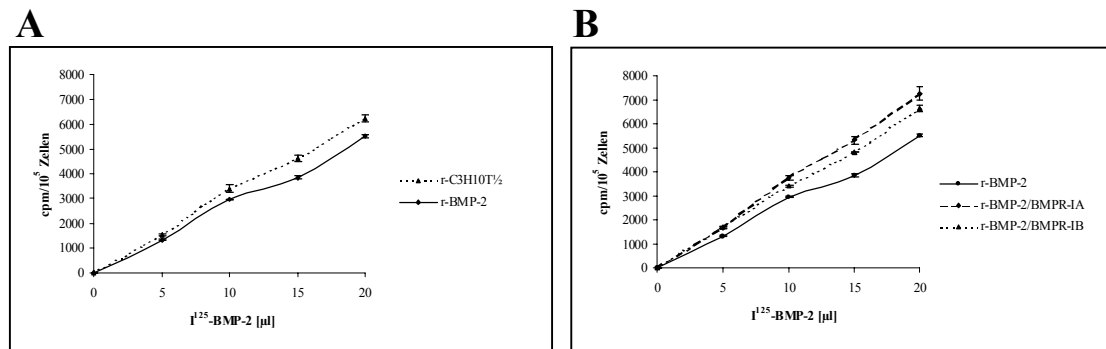
Ein eher subjektives Quantifizieren der Alkalische Phosphatase-Aktivität (ALP) durch Zählung der positiv gefärbten Zellen zeigt im Vergleich zur BMP-2 exprimierenden Kultur eine leichte Zunahme an ALP-positiven Zellen in BMP-2 und BMPR-IB exprimierenden C3H10T½-Zellen. Eine signifikante Steigerung der Zahl kann in der Kultur mit BMP-2 und BMPR-IA Expression beobachtet werden (Abbildung 2.4.11).

Die Überexpression funktioneller BMP Typ I Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T½-Zellen führt zu einer Steigerung der BMP-2 abhängigen Differenzierung. Hierbei führt die Expression von BMPR-IB zu einer schwächeren Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung als BMPR-IA; die Induktion durch den BMP Typ IB Rezeptor weist eher einen osteo- und adipogenen Charakter auf, während die Induktion durch BMP Typ IA Rezeptor vor allem der chondrogenen Differenzierungsrichtung zuzuordnen ist.

### 2.4.3.3 Rezeptor-Liganden Bindungsstudien

Zum Nachweis der Funktionalität rekombinant exprimierter BMP Typ I Rezeptoren wurden Bindungsstudien mit  $I^{125}$ -markiertem BMP-2 durchgeführt (Kapitel 5.6). Hierbei zeigt sich, daß BMP-2 exprimierende Zellen deutlich weniger radioaktiv markiertes BMP-2 binden als parentale C3H10T½-Zellen (Abbildung 2.4.12A). Die Reduktion der Bindung von radioaktivem BMP-2 läßt sich auf kompetitive Eigenschaften von rekombinant exprimiertem BMP-2 hinsichtlich der Rezeptorbindung zurückführen und liefert einen Hinweis, daß die Zelllinie r-BMP-2 funktionell aktives BMP-2 exprimiert und ins Kulturmedium sezerniert. Die Expression von BMP Typ I Rezeptoren geht mit einer signifikant gesteigerten Bindung von markiertem BMP-2 einher, welches auf Expression und Präsentation funktioneller BMP Typ I Rezeptoren in den etablierten Zelllinien schließen läßt (Abbildung 2.4.12B).





**Abbildung 2.4.12:** BMP-2 Bindungsstudien in BMP Typ I Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

- A Bindung von  $I^{125}$ -BMP-2 durch r-C3H10T $\frac{1}{2}$  und r-BMP-2 nach Erreichen der Konfluenz
- B Bindung von  $I^{125}$ -BMP-2 durch r-BMP-2, r-BMP-2/BMPR-IA und r-BMP-2/BMPR-IB nach Erreichen der Konfluenz
- Die Konzentration des eingesetzten  $I^{125}$ -BMP-2 betrug  $c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ . Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Kernfärbung mit Hämatoxylin (Kapitel 5.2.7.6) und Auszählen der gefärbten Zellkerne adäquater Referenzkulturen.

Eine Zuordnung der Bindungsaffinitäten der BMP Typ I Rezeptoren bezüglich der Bindung von BMP-2 ist in den hier durchgeführten Studien nicht möglich. Die Bindungsreaktion im Hinblick auf  $I^{125}$ -BMP-2 befindet sich im linearen und nicht im Sättigungsbereich, welches auf die Bindung von rekombinantem BMP-2 an die extrazelluläre Matrix der Zellen zurückzuführen sein mag. Eine vollständige Besetzung freier BMP Rezeptoren durch BMP-2 kann nicht angenommen werden. Aufgrund der nicht evaluierten Expression von BMP-2 und der BMP Typ I Rezeptoren auf Proteinebene kann hier nur auf die Expression funktioneller BMP Typ I Rezeptoren und nicht auf Bindungsaffinitäten geschlossen werden.

#### 2.4.4 Einfluß von dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren auf die BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

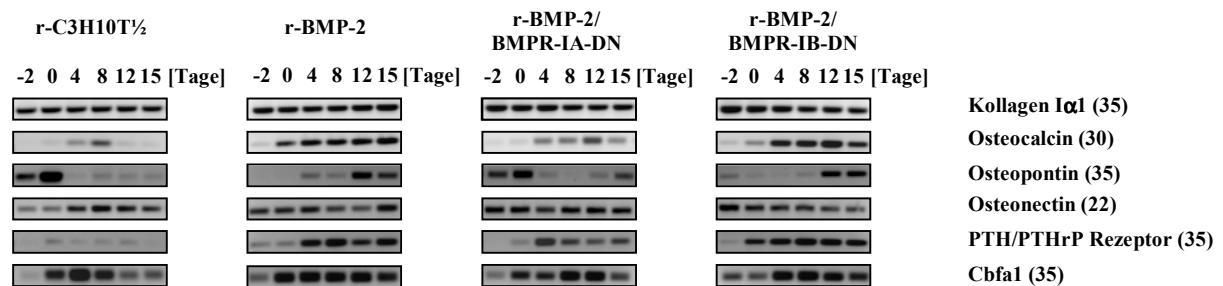
Die Expression funktioneller BMP Typ I Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen als „gain of function“-Experiment (Kapitel 2.4.3) zeigt bereits eine spezifische Modulation des chondro-/osteogenen Differenzierungspotentials in Abhängigkeit distinkter Typ I Rezeptoren. Zum Evaluieren dieser Ergebnisse werden im „loss of function“-Experiment verkürzte, inaktive BMP Typ I Rezeptoren verwendet, die kompetitiv zu inhärenten Rezeptoren das selektive Ausschalten bestimmter Signalwege ermöglichen. Die hier eingesetzten dominant-negativen („truncated“) BMP Typ I Rezeptoren binden zwar ihre Liganden und bilden die entsprechenden BMP Rezeptorkomplexe aus, aber eine Weiterleitung des Liganden-abhängigen Signals wird durch das Fehlen der Kinasedomäne unterbunden.

Durch Überexpression dominant-negativer BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und nachfolgender Differenzierungskultur soll der Einfluß der spezifischen BMP Typ IA und Typ IB Signalwege auf das BMP-2 abhängige chondro-/osteogene Potential ermittelt werden.

### 2.4.4.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMP-2 und BMPR-I-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

#### 2.4.4.1.1 Expressionsprofil osteogener Markergene

Durch Expression dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren und Ausschalten distinkter BMP2-abhängiger Signalwege wird die Expression osteogener Markergene durch den dominant-negativen BMP Typ IA Rezeptor deutlich reprimiert. Demgegenüber zeigt die Expression von dominant-negativem BMP Typ IB Rezeptor eine minimale Repression der osteogenen Markergene in der BMP2-abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Abbildung 2.4.13).



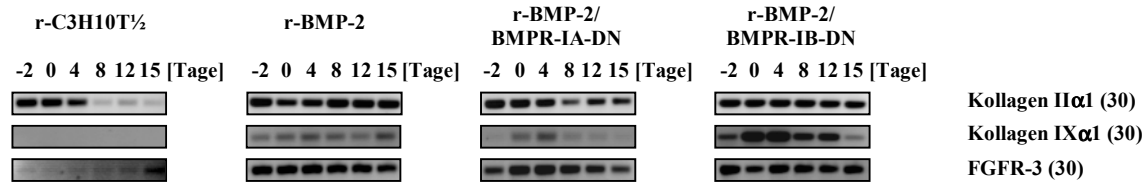
**Abbildung 2.4.13:** Einfluß von dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren auf die Expression osteogener Markergene in der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Die Expression von Kollagen Typ I wird durch dominant-negative BMP Typ I Rezeptoren nicht moduliert. Hingegen wird die Expression von Osteocalcin durch BMPR-IA-DN deutlich reprimiert, während in den BMP-2 und BMPR-IB-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine zeitlich verzögerte Induktion von Osteocalcin erst am Tag 4 der Kultur beobachtet werden kann. Dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren und BMP-2 exprimierende Zellen weisen ein biphasisches Expressionsmuster an Osteopontin auf, welches vergleichbar mit parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine hohe Expression während der proliferativen Phase zeigt. Demgegenüber wird in BMP-2 exprimierenden Zellen Osteopontin während der Proliferationsphase reprimiert und in späterer Kultur induziert; dieses Expressionsprofil zeigt sich, wenn auch in abgeschwächter Ausprägung, ebenfalls in BMP-2 und dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen. Im Vergleich zu BMP-2 exprimierenden Zellen wird die Expression von Osteonectin durch den dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptor nur marginal reprimiert; ein signifikanter Einfluß von dominant-negativem BMP Typ IA Rezeptor kann nicht beobachtet werden. Eine Repression des PTH/PTHrP-Rezeptors zeigt sich in den BMPR-IA-DN und BMP-2 exprimierenden Zellen, während die Expression von dominant-negativem BMP Typ IB Rezeptor zu einer schwachen Induktion des PTH/PTHrP-Rezeptors führt. Cbfa-1 wird durch die Expression dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren schwach reprimiert.

### 2.4.4.1.2 Expressionsprofil chondrogener Markergene

Die BMP-2 abhängige Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen entlang der chondrogenen Entwicklungsrichtung wird durch die Expression dominant-negativer BMP Typ IA und nicht durch dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren gehemmt (Abbildung 2.4.14).



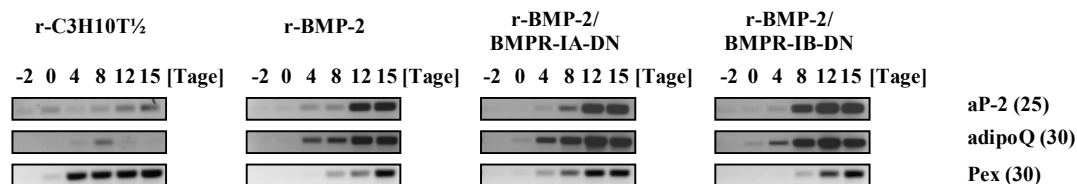
**Abbildung 2.4.14:** Einfluß von dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren auf die Expression chondrogener Markergene in der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Durch Expression des dominant-negativen BMP Typ IA Rezeptors in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden die chondrogenen Markergene Kollagen Typ II und Typ IX deutlich reprimiert; die Expression von FGFR-3 wird ebenfalls schwach negativ reguliert. Demgegenüber führt die Expression des dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptors zu einer Induktion von Kollagen Typ IX, während die Expression von FGFR-3 und Kollagen Typ II nicht beeinträchtigt wird.

### 2.4.4.1.3 Expressionsprofil adipogener Markergene und Pex-Expression

Die BMP-2 abhängige adipogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird durch die Expression dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren schwach induziert (Abbildung 2.4.15).

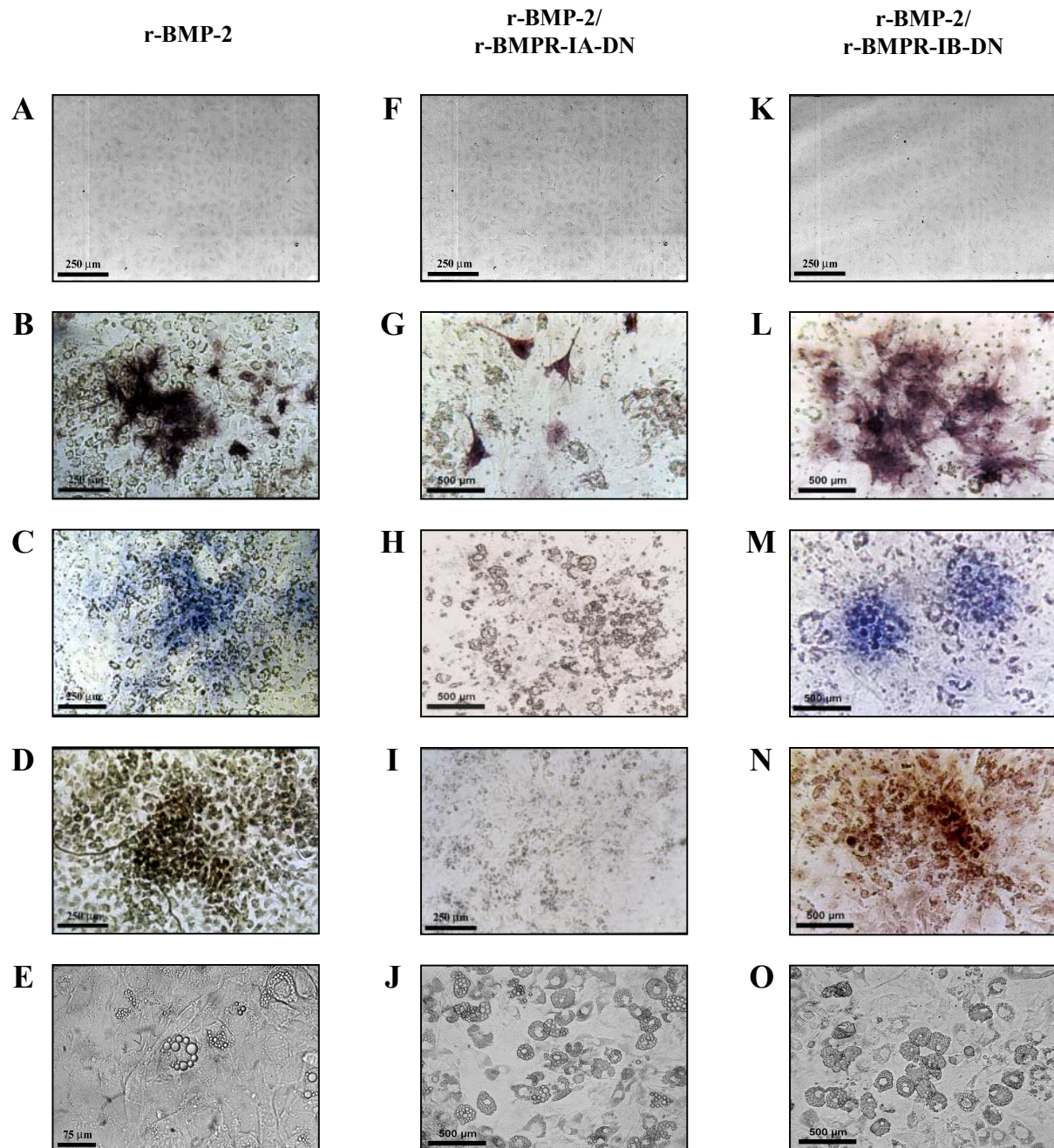


**Abbildung 2.4.15:** Einfluß von dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren auf die Expression adipogener Markergene in der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Die Repression der Pex-Expression während der BMP-2 abhängigen Differenzierung wird durch dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren nicht wesentlich moduliert; Pex wird durch Expression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren deutlich schwächer reprimiert.

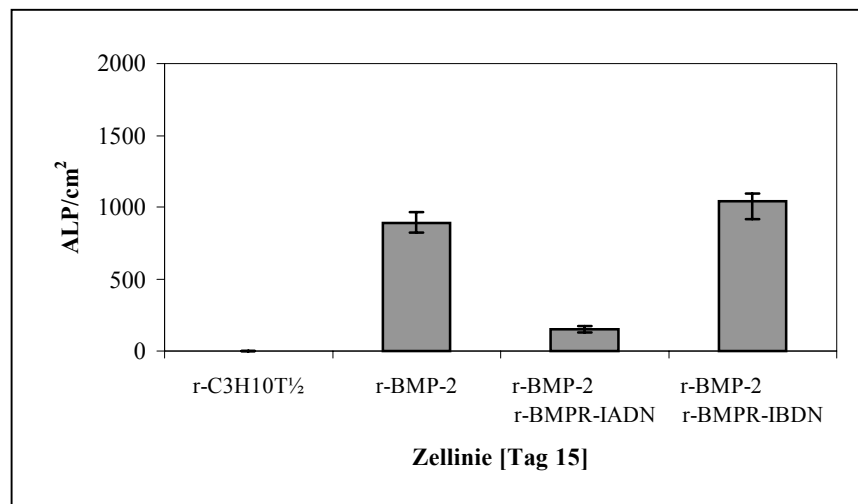
#### 2.4.4.2 Histologische Färbungen zur BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung in BMP-2/BMPR-I-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen



**Abbildung 2.4.16:** Morphologie und histologische Färbungen

- |  |   |
|--|---|
| A r-BMP-2, Tag 0, PhaKo                | I r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN, Tag 15, von Kossa         |
| B r-BMP-2, Tag 15, ALP                 | J r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |
| C r-BMP-2, Tag 15, Alcian              | K r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN, Tag 0, PhaKo              |
| D r-BMP-2, Tag 15, von Kossa           | L r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN, Tag 15, ALP               |
| E r-BMP-2, Tag 15, Adipozyten, PhaKo   | M r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN, Tag 15, Alcian            |
| F r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN, Tag 0, PhaKo   | N r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN, Tag 15, von Kossa         |
| G r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN, Tag 15, ALP    | O r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |
| H r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN, Tag 15, Alcian |   |

C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die sowohl rekombinant BMP-2 und die jeweiligen dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren exprimieren, zeigen hinsichtlich der Zellmorphologie ein ähnlich heterogenes Erscheinungsbild wie BMP-2 exprimierende Zellen. Im Vergleich mit BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ist in den BMP-2 und dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Kulturen eine leicht erhöhte Anzahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen zu beobachten (Abbildung 2.4.16B/L). Die Färbung von chondrogenen Matrixkomponenten und Mineralisierungszonen weist in den BMP-2 und BMP-IB-DN exprimierenden Zellen eine vergleichbare Intensität zu BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen auf (Abbildung 2.4.16C/M/D/N). Wird der Typ IA Rezeptor in dominant-negativer Version in BMP-2 exprimierenden Zellen exprimiert, ist eine deutliche Repression der BMP-2 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung auf histologischer Ebene festzustellen (Abbildung 2.4.16G/H/I); die Anzahl Alkalischer Phosphatase-positiver Zellen ist reduziert, Mineralisierungszonen und chondrogene Matrixbestandteile können nicht gefärbt werden. Auch können in diesen Kulturen keine morphologisch chondroiden Zellen mit charakteristischer kugeligter Gestalt beobachtet werden. Dementgegen kann in beiden dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren exprimierenden Kulturen eine Zunahme an Adipozyten im Laufe der in vitro-Differenzierung beobachtet werden (Abbildung 2.4.16E/J/O).



**Abbildung 2.4.17:** Alkalische Phosphatase-positive Zellen in BMP-2 und dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die Bestimmung der Anzahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen erfolgte über dreimaliges Auszählen der jeweiligen Kulturen. Dargestellt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen im Mittel und die korrespondierende Standardabweichung.

Durch Ausschalten des BMP Typ IA Rezeptor Signalweges in BMP-2 exprimierenden Zellen wird die Zahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen deutlich verringert. Die Expression dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren führt hingegen zu einer tendenziell erhöhten Expression von Alkalischer Phosphatase (Abbildung 2.4.17).

Die Überexpression dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt im Fall des BMP Typ IA Rezeptors zu einer Einschränkung der BMP2-abhängigen Differenzierung. Dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren zeigen keinen signifikanten Einfluß auf die BMP-2 abhängige chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.

#### 2.4.4.3 Rezeptor-Liganden Bindungsstudien

Die Expression von dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren geht mit einer signifikant gesteigerten Bindung von I<sup>125</sup>-markiertem BMP-2 einher, welches auf Expression und Präsentation der „truncated“ Typ I Rezeptoren in den etablierten Zelllinien schließen läßt (Abbildung 2.4.18).

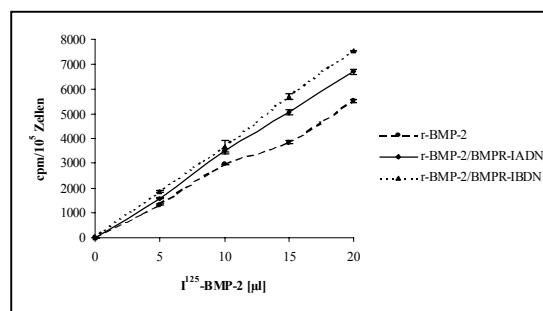


Abbildung 2.4.18: BMP-2 Bindungsstudien in dominant-negativen BMP Typ I Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Bindung von I<sup>125</sup>-BMP-2 durch r-BMP-2, r-BMP-2/BMPR-IA-DN und r-BMP-2/BMPR-IB-DN nach Erreichen der Konfluenz  
Die Konzentration des eingesetzten I<sup>125</sup>-BMP-2 betrug  $c = 1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ .  
Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch Kernfärbung mit Hämatoxylin (Kapitel 5.2.7.6) und Auszählen der gefärbten Zellkerne adäquater Referenzkulturen.

Gemäß Abbildung 2.4.18 befinden sich die Bindungsreaktionen der eingesetzten Zelllinien hinsichtlich von markiertem BMP-2 im linearen und nicht im Sättigungsbereich. Aus den bereits in Kapitel 2.4.3.3 angeführten Gründen kann auch hier nur ein Schluß auf die Präsenz rekombinanter BMP Typ I Rezeptoren und nicht auf etwaige Bindungsaffinitäten gezogen werden.



#### 2.4.4.4 Nachweis der rekombinanten Expression dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren mittels fusionierter Flag-Epitope

Zum Verifizieren der in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Einflüsse der dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren auf die BMP-2 abhängige chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen und zum Nachweis der rekombinanten Expression der Rezeptoren auf Proteinebene wurden mit Flag-Epitopen fusionierte, dominant-negative BMP Typ I Rezeptoren generiert, in ein alternatives Expressionsvektorsystem kloniert und in die BMP-2 exprimierende Zelllinie r-BMP-2 stabil transfiziert.

Das Fusionieren der Flag-Epitope an die „truncated“ BMP Typ I Rezeptoren wurde nach dem Prinzip der auf PCR basierenden cDNA-Klonierung (Kapitel 5.2.5) durchgeführt. Hierzu wurden die cDNAs der dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren im Expressionsvektor „pMTRIPLE“ als Ausgangsmaterial verwendet. Spezifische, das Flag-Epitop aufweisende Oligonukleotide (Kapitel 7.1.1 „Alk-3 truncated human“ und „Alk-6 truncated murine“) dienten zum Amplifizieren der Rezeptor-Flag-cDNA-Fusionen, welche mittels T/A-Klonierung in den Vektor „pGEM-T“ kloniert wurden. Nach Sequenzierung der resultierenden Insertionen wurden diese mit den Restriktionsenzymen EcoR-I und Sal-I aus dem Vektor „pGEM-T“ herausgeschnitten und in den mit EcoR-I und Sal-I linearisierten Expressionsvektor „pSV40-GFP; pEMBL-Derivat“ ligiert (Abbildung 2.4.19).

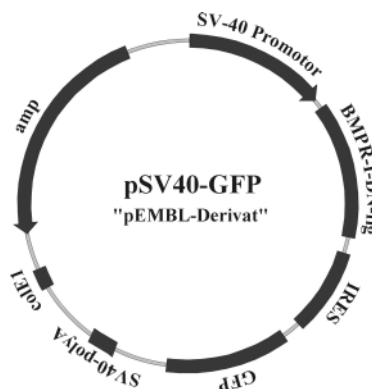
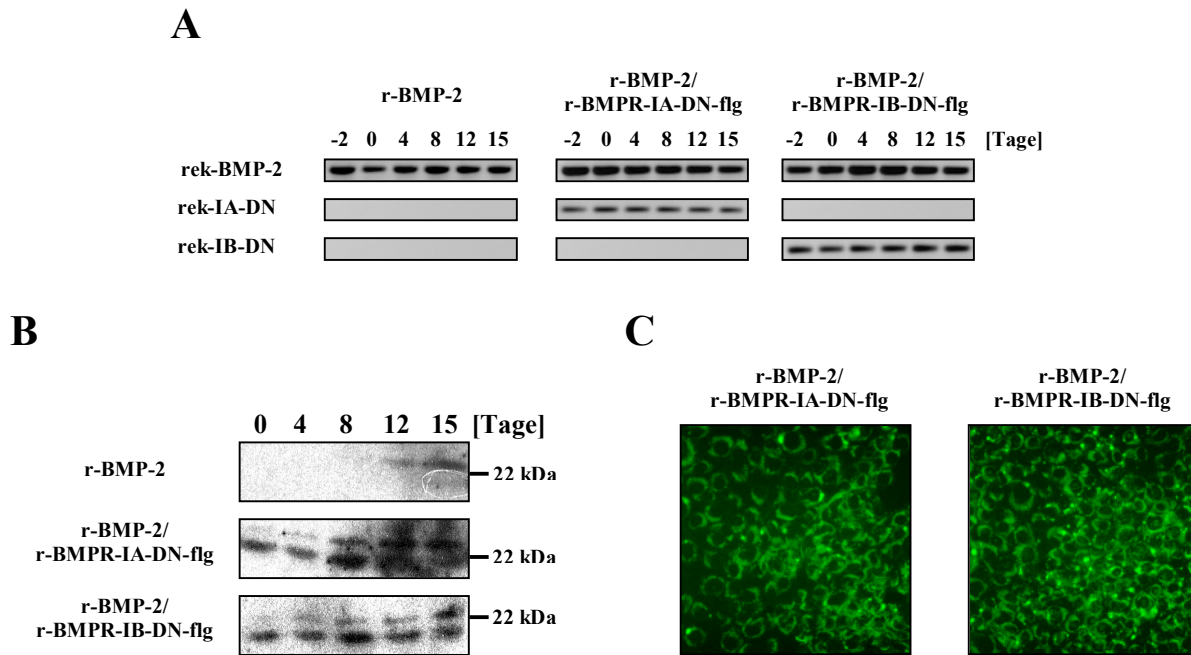


Abbildung 2.4.19: Expressionsvektor „pSV40-GFP“ zur Expression von dominant-negativen BMPR-I-Flag Fusionsproteinen

Die Expressionskonstrukte für dominant-negative BMP Typ I-Flag Rezeptoren wurden mit dem Selektionsplasmid „pBSpacΔp“ in BMP-2 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen liposomal kotransfiziert (Kapitel 5.4.6). Unter Selektionsdruck (750 µg/ml G418, 2,5 µg/ml Puromycin) entstehende Einzelkolonien wurden hinsichtlich ihrer rekombinanten Expression analysiert und vereinigt, so daß Mischklone aus zehn bis fünfzehn Einzelklonen für nachfolgende Differenzierungsstudien analog zu den bereits beschriebenen Kulturen zur Verfügung standen.

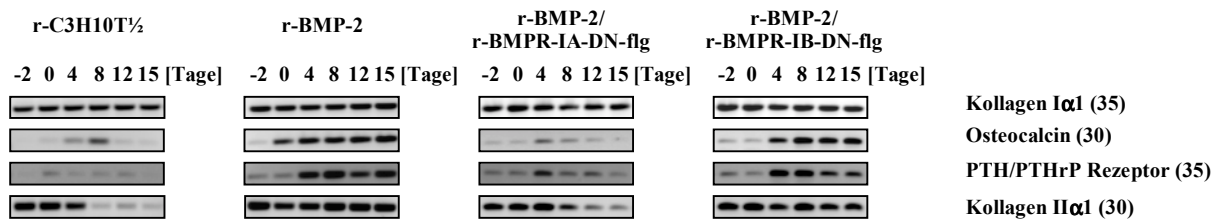


**Abbildung 2.4.20:** Etablierung der dominant-negativen BMPR-I Flag-Rezeptoren exprimierenden Zelllinien r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN-flg und r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN-flg

- A Nachweis der Expression des rekombinanten BMP-2 und der Typ I Rezeptoren auf mRNA-Ebene zu bestimmten Kulturzeitpunkten; die hier eingesetzten Oligonukleotide zum Amplifizieren der rekombinanten cDNAs sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1 µl cDNA und 30 PCR-Zyklen verwendet.
- B Nachweis der Expression der rekombinanten BMPR-I-DN auf Proteinebene zu bestimmten Kulturzeitpunkten.
- C Nachweis der GFP-Expression in dominant-negativen BMPR-I exprimierenden Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie; Tag 0, nach Erreichen zellulärer Konfluenz.

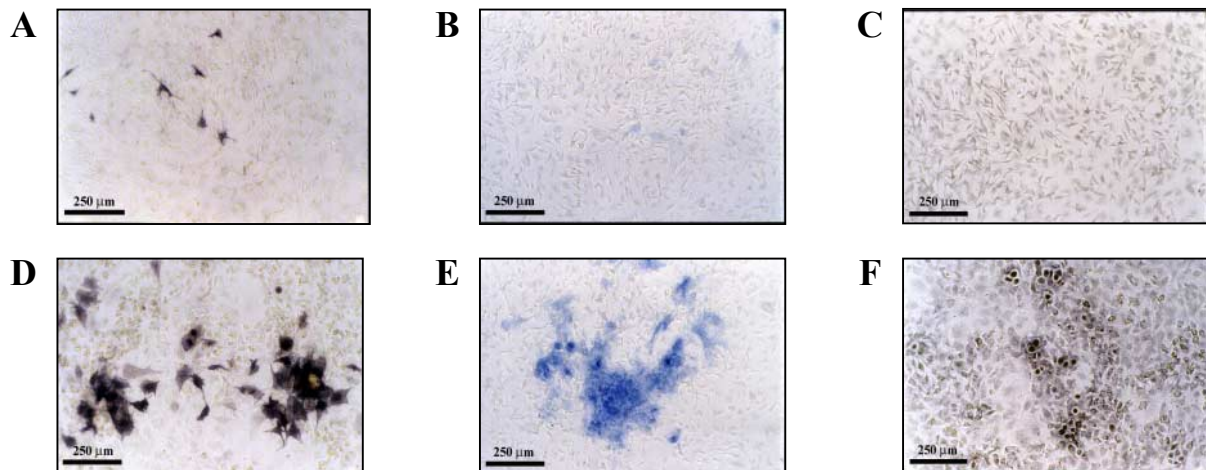
Die in einem alternativen Vektorsystem vorliegenden dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren werden unter Selektionsbedingungen über den gesamten Kulturzeitraum hinweg exprimiert, welches sowohl auf mRNA/cDNA-Ebene als auch auf Proteinebene gezeigt werden konnte (Abbildung 2.4.20A/B). Zum Nachweis der rekombinanten Expression auf Proteinebene wurden 50 µg Gesamtprotein entsprechender Kulturzeitpunkte in einem SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Der Nachweis erfolgte mittels monoklonaler Peroxidase-gekoppelter Antikörper, welche das fusionierte Flag-Epitop erkennen (Kapitel 5.7). Desweiteren konnte die Expression des GFP-Reportergens mittels der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 2.4.20C) aufgezeigt werden (Kapitel 5.4.7.8).





**Abbildung 2.4.21:** Einfluß von BMPR-I-DN-flg Rezeptoren auf die Expression chondro-/osteogen Markergene in der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T½-Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondro-/osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1 µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.



**Abbildung 2.4.22:** Morphologie und histologische Färbungen

- A r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN-flg, Tag 15, ALP
- B r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN-flg, Tag 15, Alcian
- C r-BMP-2/r-BMPR-IA-DN-flg, Tag 15, Kossa
- D r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN-flg, Tag 15, ALP
- E r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN-flg, Tag 15, Alcian
- F r-BMP-2/r-BMPR-IB-DN-flg, Tag 15, Kossa

Die in den Kapiteln 2.4.4.1 bis 2.4.4.3 dargestellten Ergebnisse zur BMP Typ I Rezeptor abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung BMP-2 exprimierender C3H10T½-Zellen konnten im alternativen Ansatz mit Flag-Epitop fusionierten, dominant-negativen Typ I Rezeptoren bestätigt werden. Die Induktion typischer chondro-/osteogener Markergene in der BMP-2 abhängigen Differenzierung wird durch die Expression von dominant-negativen BMP Typ IA Rezeptoren deutlich reprimiert, während die Expression von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren nur zu einer marginalen Modulation der chondro-/osteogenen Markergene führt. Dieses ist exemplarisch für die Markergene Kollagen Typ I, Osteocalcin, PTH/PTHrP-Rezeptor und Kollagen Typ II in Abbildung 2.4.21 dargestellt.

Auch auf Ebene histologischer Färbungen konnte erneut gezeigt werden, daß die BMP-2 abhängige chondro-/osteogene Differenzierung selektiv durch Ausschalten des BMP Typ IA Rezeptors unterbunden wird, während die rekombinante Expression von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren keinen signifikanten Einfluß auf die BMP-2 vermittelte Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigt (Abbildung 2.4.22).

#### 2.4.4.5 Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vivo*

Im Zuge einer Kooperation mit Dan Gazit, Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel konnte das *in vivo* Differenzierungsverhalten der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in ektopischen Transplantationsexperimenten eingehender untersucht werden. Hierzu wurden Mäusen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in einem Kollagenschwamm intramuskulär transplantiert und nach 20 Tagen *in vivo* hinsichtlich ihres Differenzierungspotentials verifiziert (Abbildung 2.4.23).

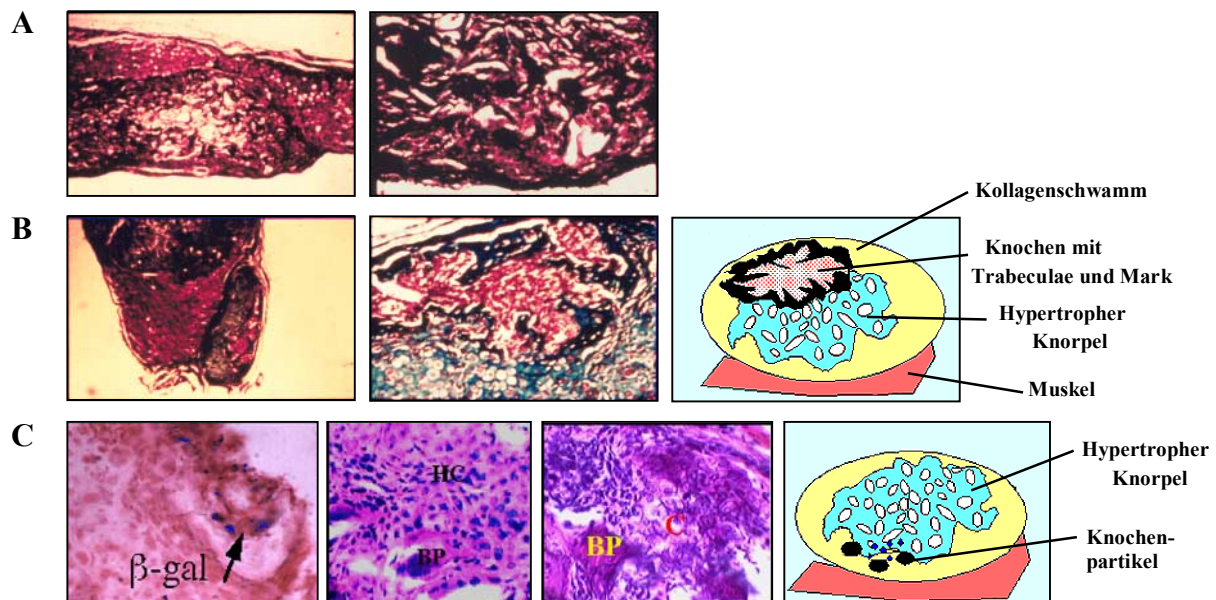


Abbildung 2.4.23: Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vivo*

- A *In vivo* Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nach 20 Tagen in ektopischen, intramuskulären Transplantaten
- B *In vivo* Differenzierung von rh-BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nach 20 Tagen in ektopischen, intramuskulären Transplantaten
- C *In vivo* Differenzierung von r-BMP-2/r-BMP-IB-DN; nach 20 Tagen in ektopischen, intramuskulären Transplantaten

In früheren Transplantationsexperimenten konnte bereits gezeigt werden, daß parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen keine chondro-/osteogene Differenzierung *in vivo* zeigen. Nach 20 Tagen *in vivo* kann nur fibröses, bindegewebsartiges Gewebe ausgemacht werden, welches sich als unstrukturiert und undifferenziert erweist (Abbildung 2.4.23A). C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hingegen, die rekombinant BMP-2 exprimieren, zeigen nach 20 Tagen *in vivo* eine ausgeprägte chondro-/osteogene Entwicklung auf. Wie in der Übersichtszeichnung der Abbildung 2.4.23B dargestellt, werden hypertropher Knorpel und reife Knochenstrukturen mit Trabeculae und Mark ausgebildet.

Die Transplantation von BMP-2 und dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt zur Ausbildung hypertrophen Knorpels und vereinzelter knochenartigen Partikeln. Die Reifung distinkter Knochenstrukturen kann hier nicht beobachtet werden (Abbildung 2.4.23C). BMP-2 und dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen keine chondro-/osteogene Differenzierung *in vivo* (hier nicht explizit dargestellt); ähnlich den parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen findet sich auch hier unstrukturiertes und undifferenziertes Gewebe.

Durch diese *in vivo* Differenzierungsexperimente wird bestätigt, daß die BMP-2 abhängige chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen durch Expression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren unterbunden wird. Die durch BMP-2 induzierte chondro-gene Entwicklung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird durch dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren nicht beeinträchtigt, während die weiterführende osteogene Differenzierung gestört oder verzögert zu sein scheint.

#### **2.4.5 Einfluß von BMP Typ IA Rezeptoren auf die chondro-/osteogene Differenzierung von parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

In den vorangegangenen Kapiteln konnte die Wechselbeziehung und Abhängigkeit der BMP-2 vermittelten Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  im Hinblick auf maßgebliche BMP Typ I Rezeptoren dargelegt werden. Zum umfassenden Verifizieren dieser Befunde und zum Evaluieren der Wirkung inhärent exprimierter Liganden und Rezeptoren wird hier der Einfluß und das Potential der BMP Typ I Rezeptoren hinsichtlich der chondro-/osteogenen Differenzierung in parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen losgelöst von der Expression von rekombinantem BMP-2 eingehender dargestellt.

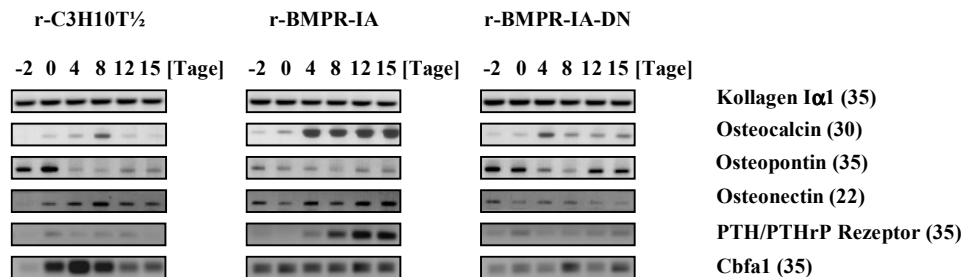
##### **2.4.5.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMPR-IA und BMPR-IA-DN exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

###### **2.4.5.1.1 Expressionsprofil osteogener Markergene**

Die alleinige Expression funktioneller BMP Typ IA Rezeptoren in parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt unter Differenzierungsbedingungen zu einer im Vergleich zu BMP-2 exprimierenden Zellen schwachen Induktion osteogener Markergene. Demgegenüber wird die inhärente Expression dieser Gene durch das Ausschalten des BMP Typ IA Rezeptor vermittelten Signalweges nicht beeinflusst oder aber reprimiert (Abbildung 2.4.24).

Rekombinant BMP Typ IA Rezeptor exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen eine deutliche Induktion der Expression von Osteocalcin und des PTH/PTHrP-Rezeptors im Laufe des Kulturzeitraumes. Osteonectin und Cbfa-1 werden eher schwach induziert, wobei Cbfa-1 im Gegensatz zu parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen über den gesamten Kulturzeitraum in gleichbleibender Höhe exprimiert wird. Die hohe Expression an Osteopontin während der proliferativen Kulturphase wird durch die Expression von BMP Typ IA Rezeptoren reprimiert, eine Induktion in später Kultur kann nicht beobachtet werden. Die Expression von Kollagen Typ I wird weder durch die Expression funktioneller noch dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren beeinflusst.

Auch die Expression von Osteocalcin und des PTH/PTHrP-Rezeptors wird durch dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren nicht moduliert. Osteopontin hingegen weist ein biphasisches Expressionsmuster auf, in welchem die Expression in der späten Kulturphase durch rekombinante dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren induziert wird. Im Gegensatz hierzu werden die osteogenen Markergene Osteonectin und Cbfa-1 deutlich schwächer exprimiert als in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.

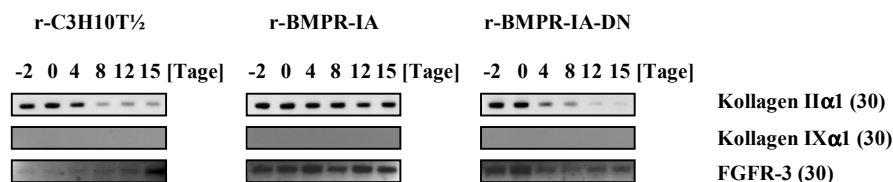


**Abbildung 2.4.24:** Einfluß des BMP Typ IA Rezeptors auf die Expression osteogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

#### 2.4.5.1.2 Expressionsprofil chondrogener Markergene

Eine schwache Stimulation der chondrogenen Differenzierung kann auf Ebene chondrogener Markergene in den BMP Typ IA Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen beobachtet werden (Abbildung 2.4.25).



**Abbildung 2.4.25:** Einfluß des BMP Typ IA Rezeptors auf die Expression chondrogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

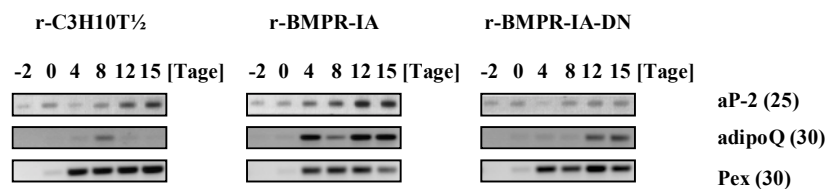
Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Die Expression funktioneller BMP Typ IA Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt unter Differenzierungsbedingungen zur Induktion der chondrogenen Markergene FGF-Rezeptor-3 und Kollagen Typ II. Eine Expression von Kollagen Typ IX kann weder in den rekombinant BMPR-IA, parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen noch in den dominant-negativen BMP Typ IA Rezeptor exprimierenden Zellen detektiert werden.

Desweiteren wird durch das Ausschalten des BMP Typ IA Rezeptor abhängigen Signalweges die inhärente Expression von Kollagen Typ II reprimiert. Parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen im gesamten Kulturzeitraum eine schwache Expression von FGFR-3, die zum Ende der Kultur leicht erhöht zu detektieren ist. Dieses Expressionsmuster wird durch Expression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren revertiert; hier ist eine leicht erhöhte Expression während der proliferativen Kulturphase zu beobachten. Nach Erreichen der zellulären Konfluenz wird der FGFR-3 nur noch schwach exprimiert.

#### 2.4.5.1.3 Expressionsprofil adipogener Markergene und Pex-Expression

Die Expression der adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ wird durch rekombinante Expression von funktionellen BMP Typ IA Rezeptoren schwach induziert. Auf Seiten dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren ist hingegen eine Repression der aP-2 Expression festzustellen, während adipoQ gegen Ende der Kultur dereguliert respektive schwach induziert wird (Abbildung 2.4.26).



**Abbildung 2.4.26:** Einfluß des BMP Typ IA Rezeptors auf die Expression adipogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1 µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

In parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird nach Erreichen zellulärer Konfluenz die Expression von Pex induziert und bleibt über den gesamten Kulturzeitraum auf einem hohen Expressionsniveau erhalten. C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die funktionelle oder dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren rekombinant exprimieren, zeigen ebenfalls, wenn auch in abgeschwächter Form, eine Induktion der Pex-Expression während der Differenzierungsphase.

Die Überexpression rekombinanter BMP Typ IA Rezeptoren in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt im Hinblick auf die Expression chondro-/osteogener und adipogener Markergene zu einer schwach ausgeprägten Differenzierung der Zellen in die chondro-/osteogene Entwicklungsrichtung. Die inhärente Expression dieser Markergene wird durch Ausschalten oder Blockade des BMP Typ IA Rezeptor vermittelten Signalweges nicht beeinträchtigt oder aber dereguliert respektive reprimiert.



### 2.4.5.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung BMP Typ IA Rezeptorvarianten exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Im Gegensatz zu parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die eine typische fibroblastoide Morphologie unter den hier verwendeten Differenzierungsbedingungen aufweisen und einschichtig als „*Monolayer*“ wachsen (Abbildung 2.4.27A/B), zeigen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche BMP Typ IA Rezeptoren rekombinant exprimieren eine veränderte Morphologie. Die Zellen stellen die Vermehrung nach Erreichen der zellulären Konfluenz nicht ein und wachsen vielschichtig als „*Multilayer*“. Ähnlich den BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen können auch hier phänotypisch Zellen unterschiedlichster Gestalt ausgemacht werden; es sind langgestreckt fibroblastoide, stellare, eher rundliche Zellen und vereinzelt Zellen mit Lipidtröpfchen in einer morphologisch sehr heterogenen Kultur zu beobachten (Abbildung 2.4.27C/D).

Auch die Überexpression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren führt zu einer Veränderung der Morphologie. Während auch hier die Zellen zum Zeitpunkt der Konfluenz dicht gepackt erscheinen, stellen sie ihre Vermehrung ein und zeigen im Laufe der weiteren Kultur nur noch rudimentäre Zell-Zell-Kontakte. Die Zellen separieren sich voneinander und wirken abgerundet und kontrastarm (Abbildung 2.4.27E/F).

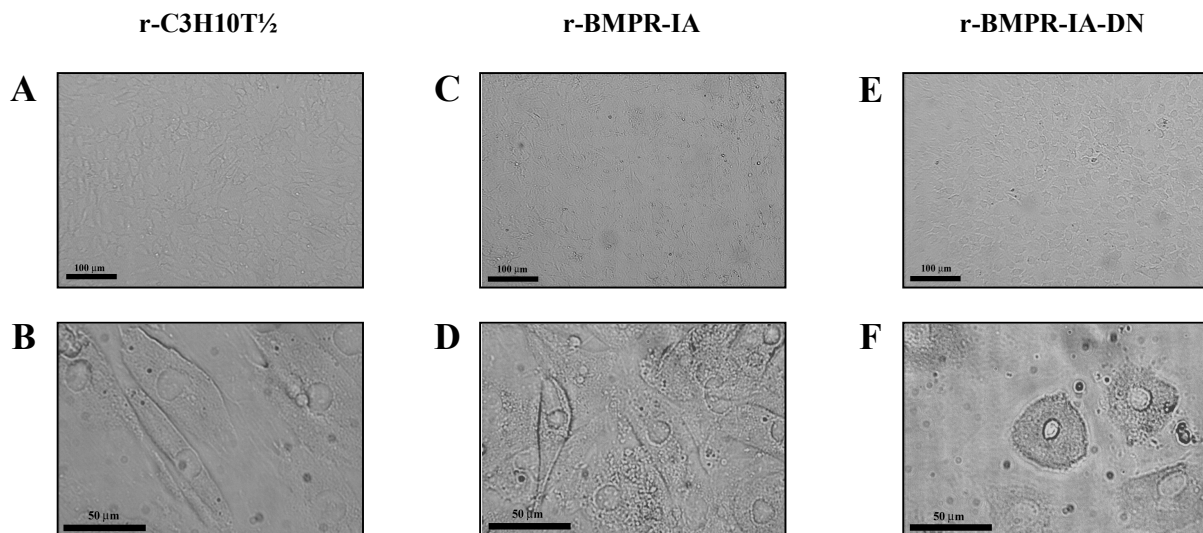


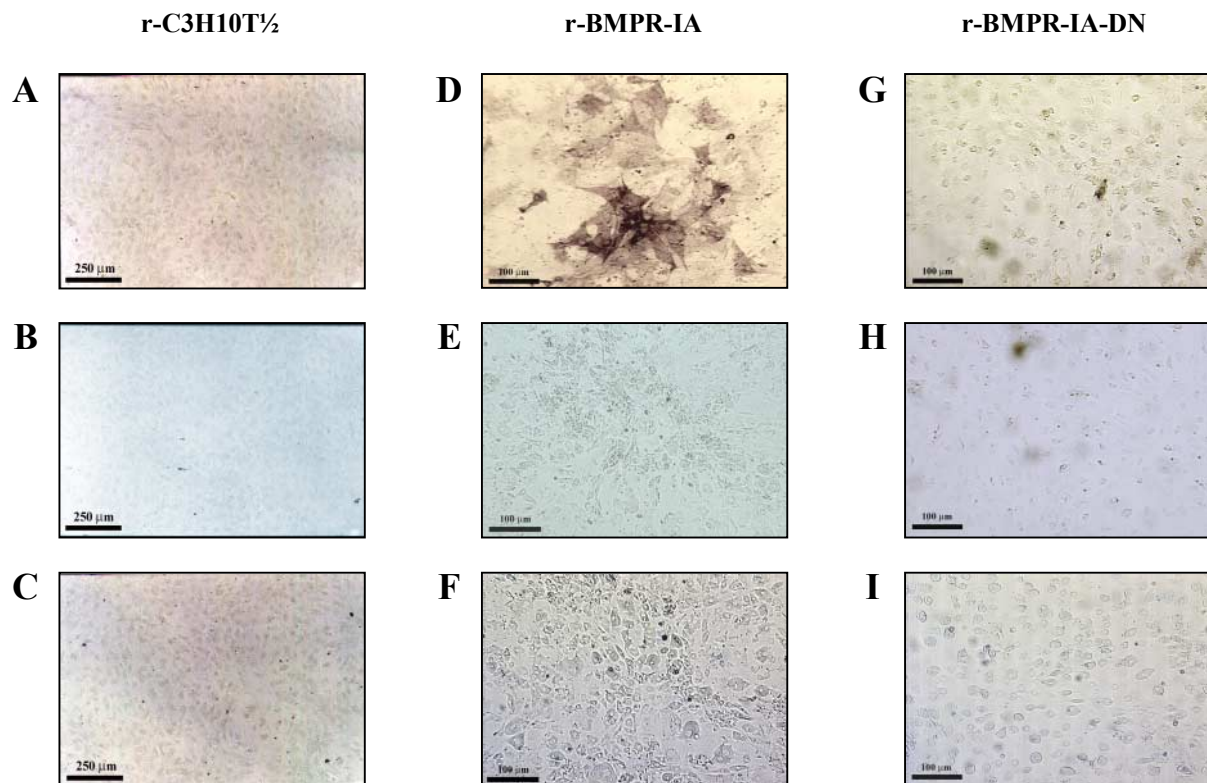
Abbildung 2.4.27: Morphologische Veränderungen BMP Typ IA Rezeptorvarianten exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

A r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 0, PhaKo  
B r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, PhaKo  
C r-BMPR-IA, Tag 0, PhaKo

D r-BMPR-IA, Tag 15, PhaKo  
E r-BMPR-IA-DN, Tag 0, PhaKo  
F r-BMPR-IA-DN, Tag 15, PhaKo

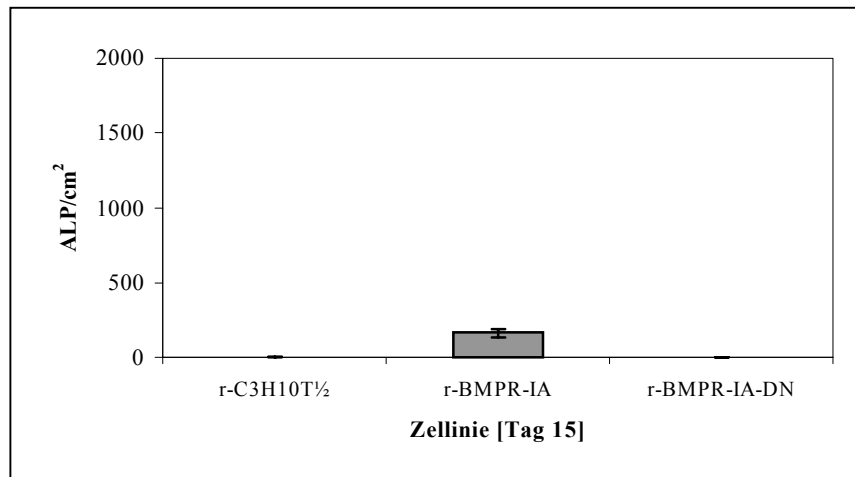
Neben den diversen morphologischen Veränderungen der BMP Typ IA Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen können in histologischen Färbungen vereinzelt und in Gruppen Zellen ausgemacht werden, die Alkalische Phosphatase exprimieren (Abbildung 2.4.28D/2.4.29). Im Laufe der Kultur können aber Proteoglykane als Komponenten der chondrogenen extrazellulären Matrix oder Ablagerungen von Kalzium in distinkten Mineralisierungszonen nicht detektiert werden (Abbildung 2.4.28E/F).

Ähnlich den Kulturen parentaler C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Abbildung 2.4.28A/B/C) können in Kulturen, die rekombinant dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren exprimieren, weder Alkalische Phosphatase-positive Zellen, chondrogene Matrixbestandteile noch Mineralisierungszonen aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.28G/H/I).



**Abbildung 2.4.28:** Morphologie und histologische Färbungen

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| A r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, ALP       | F r-BMPR-IA, Tag 15, von Kossa    |
| B r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, Alcian    | G r-BMPR-IA-DN, Tag 15, ALP       |
| C r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, von Kossa | H r-BMPR-IA-DN, Tag 15, Alcian    |
| D r-BMPR-IA, Tag 15, ALP                     | I r-BMPR-IA-DN, Tag 15, von Kossa |
| E r-BMPR-IA, Tag 15, Alcian                  |                                   |



**Abbildung 2.4.29:** Alkalische Phosphatase-positive Zellen in BMP Typ IA Rezeptorvarianten exprimierenden C3H10T½-Zellen

Die Bestimmung der Anzahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen erfolgte über dreimaliges Auszählen der jeweiligen Kulturen. Dargestellt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen im Mittel und die korrespondierende Standardabweichung.

Die Expression funktioneller BMP Typ IA Rezeptoren in parentalen C3H10T½-Zellen, die keinen Hintergrund von rekombinalem BMP-2 aufweisen, ist ausreichend, um eine schwache chondro-/osteogenen Differenzierung zu initiieren. Das selektive Ausschalten dieses Signalweges führt zu einem Verlust des typischen fibroblastoiden Erscheinungsbildes.

#### **2.4.6 Einfluß von BMP Typ IB Rezeptoren auf die chondro-/osteogene Differenzierung von parentalen C3H10T½-Zellen**

Die Expression von BMP Typ IB Rezeptoren in C3H10T½-Zellen führt ebenfalls zu einer, wenn auch sehr schwachen, Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung. Parentale C3H10T½-Zellen, die rekombinant dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimieren, zeigen im Vergleich mit der Expression funktioneller BMP Typ IB Rezeptoren eine verstärkte Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung.

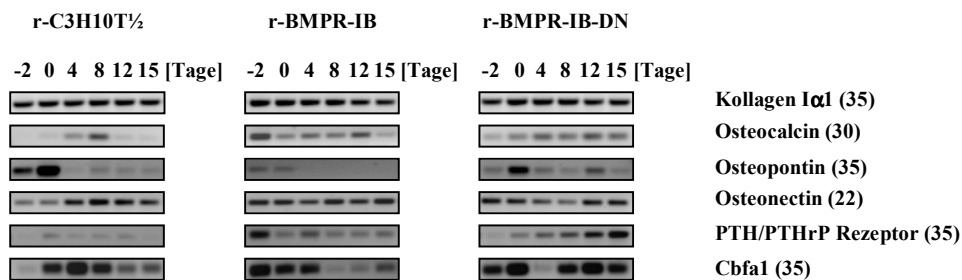
##### **2.4.6.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in BMPR-IB und BMPR-IBDN exprimierenden C3H10T½-Zellen**

###### **2.4.6.1.1 Expressionsprofil osteogener Markergene**

Sowohl durch die Expression funktioneller oder auch dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren in parentalen C3H10T½-Zellen führt zu einer schwachen Induktion spezifischer osteogener Markergene (Abbildung 2.4.30). Hier sind vor allem die Markergene Osteocalcin und der PTH/PTHrP-Rezeptor zu nennen. Die Expression von Kollagen Typ I wird in den die BMP Typ IB Rezeptorvarianten exprimierenden C3H10T½-Zellen nicht reguliert.



Osteopontin wird durch Expression des funktionellen BMP Typ IB Rezeptors reprimiert, wohingegen die Expression dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren nur zu einer marginalen Modulation des Expressionsprofils führt. Auch Osteonectin wird durch die BMP Typ IB Varianten kaum reguliert, wobei hier eine Induktion der Expression während der Proliferationsphase (Tag -2/Tag 0) festzustellen ist. In der frühen Kulturphase wird in den BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen Cbfa-1 stark exprimiert, während die Expressionshöhe in später Kultur deutlich reduziert wird. Demgegenüber wird Cbfa-1 in den dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen deutlich induziert; nur am Tag 4 der Kultur ist eine schwache Expression an Cbfa-1 zu detektieren.

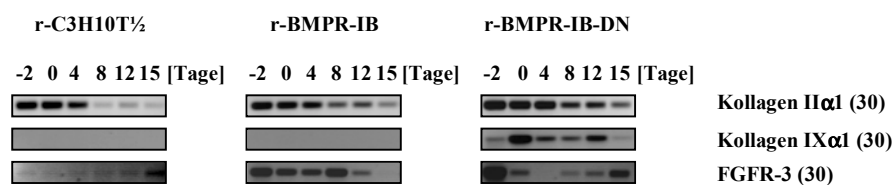


**Abbildung 2.4.30:** Einfluß des BMP Typ IB Rezeptors auf die Expression osteogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1 µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

#### 2.4.6.1.2 Expressionsprofil chondrogener Markergene

Die Induktion der chondrogenen Differenzierung ist in den BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen schwach ausgeprägt, während die Expression dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren zu einer deutlichen Induktion chondrogener Markergene führt (Abbildung 2.4.31).



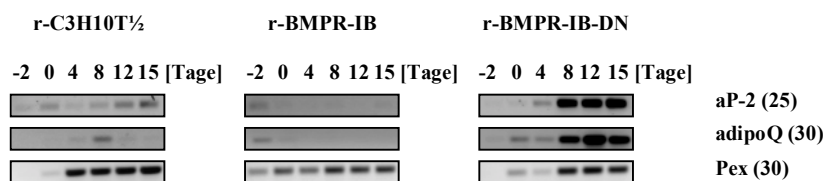
**Abbildung 2.4.31:** Einfluß des BMP Typ IB Rezeptors auf die Expression chondrogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1 µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Die Expression von BMP Typ IB Rezeptoren führt zu einer schwachen Induktion von Kollagen Typ II; Expression von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren hingegen zieht eine verstärkte Induktion der Expression von Kollagen Typ II nach sich. Auch wird die Expression von Kollagen Typ IX in dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen deutlich induziert, während analog zu parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine Expression an Kollagen Typ IX in funktionelle BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen nicht detektiert werden kann. FGFR-3 wird durch die Expression von funktionellen und dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren induziert, wobei eine Abnahme der FGFR-3 Expression in funktionelle BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in der späten Kulturphase (Tag 12/Tag 15) festzustellen ist. Das Expressionsprofil von FGFR-3 in dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen weist hingegen ein eher biphasisches Muster auf, hier ist eine hohe Expression während der Proliferationsphase und Induktion der FGFR-3 Expression in der späten Kulturphase zu detektieren.

#### 2.4.6.1.3 Expressionsprofil adipogener Markergene und Pex-Expression

Eine Expression der adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ ist in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche die funktionelle Variante des BMP Typ IB Rezeptors exprimieren, kaum zu detektieren; aP-2 und adipoQ sind deutlich reprimiert. Dem entgegengesetzt, zeigen C3H10T $\frac{1}{2}$  - Zellen, die dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimieren, eine klare Induktion der adipogenen Markergene (Abbildung 2.4.32).



**Abbildung 2.4.32:** Einfluß des BMP Typ IB Rezeptors auf die Expression adipogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1µl cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Das schwache Differenzierungspotential der BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen spiegelt sich auch in der über den gesamten Kulturzeitraum vorhandenen Expression von Pex wider. Die Expressionshöhe von Pex ist zwar erniedrigt, die Expression ist aber in der proliferativen Phase der Kultur induziert. Dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierende Zellen hingegen weisen eine leichte Repression der Pex-Expression auf.

### 2.4.6.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung BMP Typ IB Rezeptorvarianten exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die rekombinante Expression von funktionellen BMP Typ IB Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt nach Analyse der Expression chondro-/osteogener Markergene zu einer sehr schwachen Induktion der chondrogenen und osteogenen Differenzierung, welche anhand histologischer Färbungen bestätigt werden kann. Im Gegensatz hierzu kann auch in histologischen Färbungen eine verstärkte chondro-/osteogene Differenzierung in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche die dominant-negative Variante des BMP Typ IB Rezeptors exprimieren, aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.32).

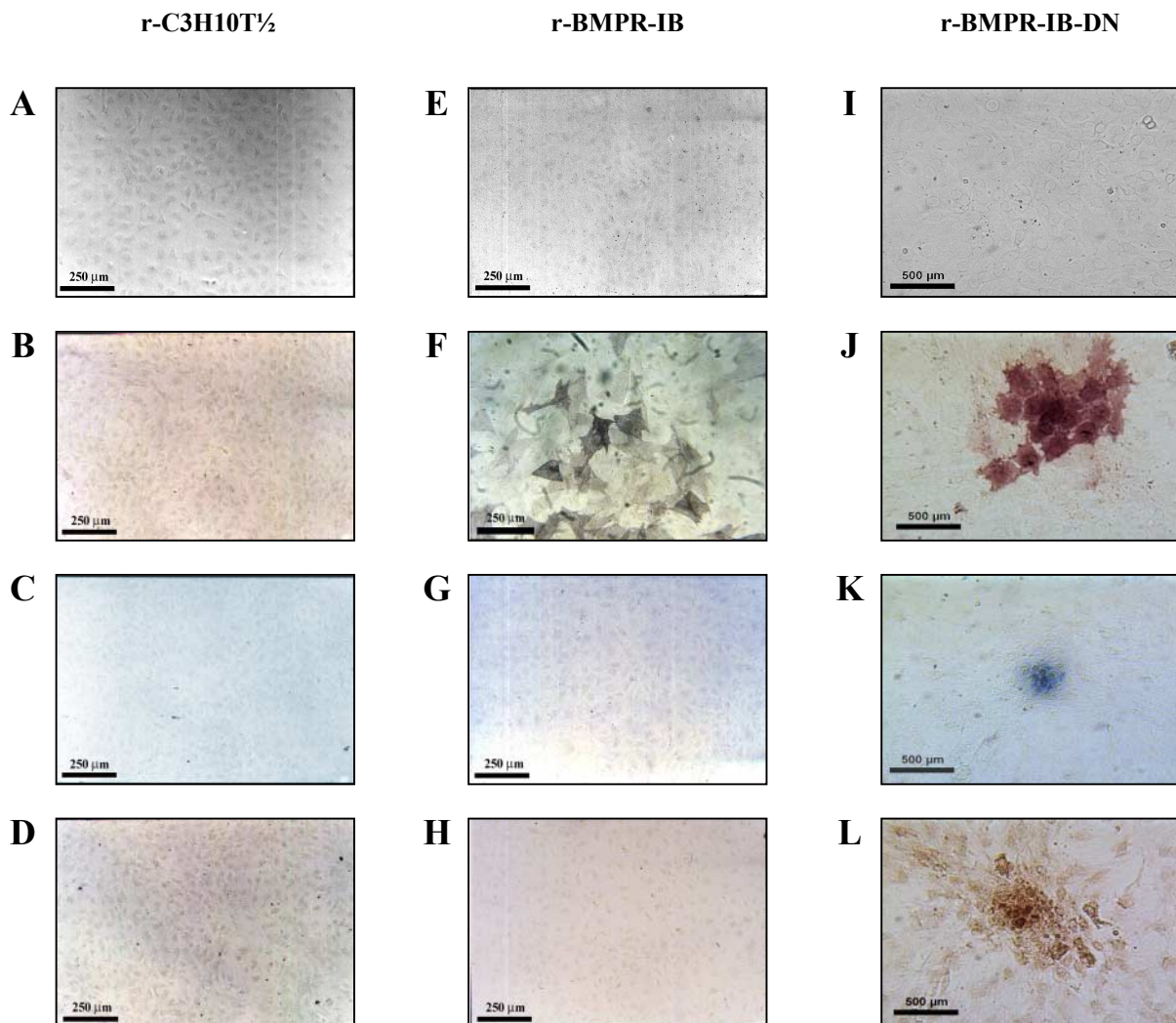


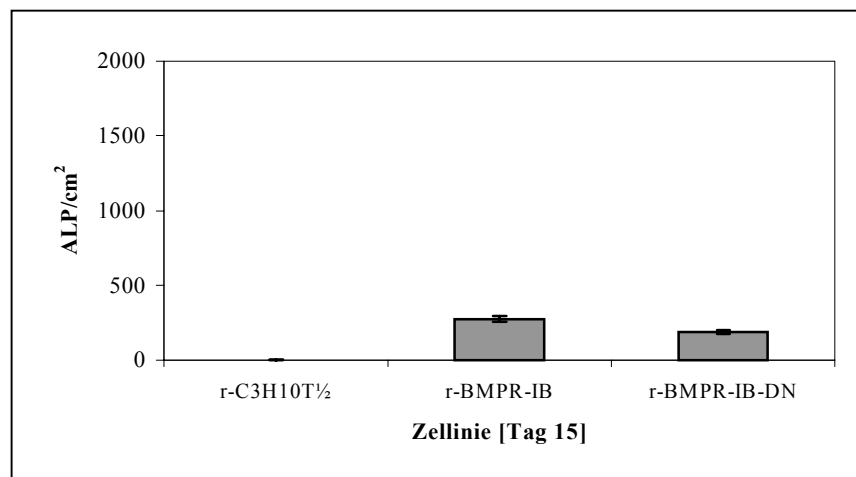
Abbildung 2.4.32: Morphologie und histologische Färbungen

- |  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| A r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 0, PhaKo      | G r-BMPR-IB, Tag 15, Alcian       |
| B r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, ALP       | H r-BMPR-IB, Tag 15, von Kossa    |
| C r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, Alcian    | I r-BMPR-IB-DN, Tag 0, PhaKo      |
| D r-C3H10T $\frac{1}{2}$ , Tag 15, von Kossa | J r-BMPR-IB-DN, Tag 15, ALP       |
| E r-BMPR-IB, Tag 0, PhaKo                    | K r-BMPR-IB-DN, Tag 15, Alcian    |
| F r-BMPR-IB, Tag 15, ALP                     | L r-BMPR-IB-DN, Tag 15, von Kossa |

Ähnlich den parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen weisen BMP Typ IB Rezeptor exprimierende Zellen ein typisches fibroblastoides Erscheinungsbild auf. Nach Erreichen zellulärer Konfluenz stellen die Zellen ihre Vermehrung ein und wachsen einschichtig als Monolayer. Auch dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierende Zellen wachsen prädominant in einschichtiger Kultur, zeigen aber distinkte Differenzierungskeime („*nodules*“), in denen mehrschichtig Zellen heterogener Morphologie zu beobachten sind.

Sowohl in funktionelle als auch in dominant-negative Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen können Alkalische Phosphatase positiv gefärbte Zellen ausgemacht werden, die im Fall der BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen vereinzelt und in dominant-negative Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen gruppiert vorliegen (Abbildung 2.4.32F/J). Hinweise auf eine chondrogene Differenzierung mit Ablagerung chondrogener Matrixkomponenten wie durch Alcian Blau Färbung darzustellende Proteoglykane oder auch die Ausbildung von distinkten Mineralisierungszonen können in den funktionelle BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Kulturen nicht aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.32G/H). Ebenso können in diesen Kulturen keine Zellen, die einen adipogenen Charakter und eingelagerte Lipidtröpfchen aufweisen, beobachtet werden.

In den distinkten Differenzierungszonen der dominant-negative BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen können neben Alkalischer Phosphatase auch Proteoglykane als Komponente chondrogener Matrix mittels Alcian Blau Färbung in geringer Zahl dokumentiert werden (Abbildung 2.4.32K). Einige dieser Differenzierungsherde zeigen zudem eine schwache Mineralisierung der extrazellulären Matrix dargestellt durch die von Kossa Färbung abgelagerten Kalziums (Abbildung 2.4.32L). Vereinzelt können in den Kulturen dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptor exprimierender Zellen auch Zellen adipogenen Charakters verzeichnet werden (hier nicht explizit dargestellt).



**Abbildung 2.4.33:** Alkalische Phosphatase-positive Zellen in BMP Typ IB Rezeptor-varianten exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die Bestimmung der Anzahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen erfolgte über dreimaliges Auszählen der jeweiligen Kulturen. Dargestellt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen im Mittel und die korrespondierende Standardabweichung.

Die Expression dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren führt verglichen mit funktionelle BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zu einer verstärkten Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung. Eine verstärkte Expression an Alkalischer Phosphatase ist in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche die dominant-negative Form des BMP Typ IB Rezeptors exprimieren, nach Bestimmung der Zahl Alkalischer Phosphatase exprimierender Zellen allerdings nicht gegeben. Sowohl die Expression von funktionellem als auch dominant-negativem BMP Typ IB Rezeptor führt zu einer Expression von Alkalischer Phosphatase auf ähnlichem Niveau (Abbildung 2.4.33).

Die Expression funktioneller BMP Typ IB Rezeptoren führt zu einer schwachen Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung parentaler C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen. Das selektive Ausschalten dieses Signalweges führt im Gegensatz hierzu zu einer gesteigerten chondro-/osteogenen Differenzierung, wobei auf der Ebene der Markergenexpression und der Histologie eine deutliche chondrogene Entwicklung ausgemacht werden kann.

#### **2.4.7 GDF-5 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

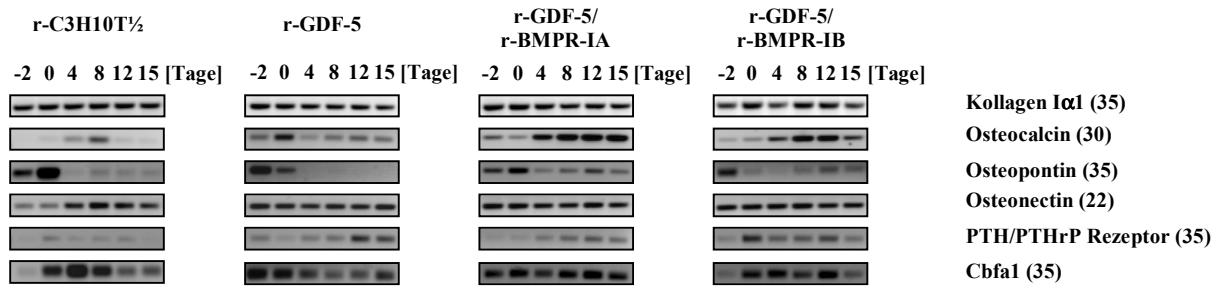
Die in den vorangegangenen Kapiteln dargestellten Differenzierungsstudien weisen auf eine Dominanz des BMP Typ IA Rezeptor vermittelten Signalweges hinsichtlich des chondro-/osteogenen Potentials von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hin, während die Expression des BMP Typ IB Rezeptors zu einer marginalen Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung führt.

Obschon die zytosolischen Komponenten der BMP Typ IB Rezeptor vermittelten Signalkaskade in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen exprimiert werden (Kapitel 2.4.1), ist die Aktivität dieses Signalweges zu verifizieren. Hierzu wurde zunächst humanes GDF-5 als prädominanter Ligand des BMP Typ IB Rezeptors in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen rekombinant exprimiert und das GDF-5 abhängige chondro-/osteogene Potential ermittelt. Zum Nachweis des Vorhandenseins eines aktiven BMP Typ IB Rezeptor vermittelten Signalweges in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurden Zelllinien generiert, die sowohl GDF-5 als Liganden des BMP Typ IB Rezeptors und den BMP Typ IB Rezeptor selbst oder auch den BMP Typ IA Rezeptor rekombinant exprimieren.

##### **2.4.7.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in der GDF-5 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

###### **2.4.7.1.1 Expressionsprofil osteogener Markergene**

Durch die rekombinante Expression von humanem GDF-5 in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kann eine schwache Induktion osteogener Markergene erzielt werden, die durch weitere Expression von BMP Typ IB Rezeptoren gesteigert wird. Aber auch die rekombinante Expression von GDF-5 und BMP Typ IA Rezeptoren führt zu einer verstärkten Induktion osteogener Markergene (Abbildung 2.4.34).



**Abbildung 2.4.34:** Expression osteogener Markergene in der GDF-5 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen.  
Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Eine eindeutige Regulation von Kollagen Typ I kann in GDF-5 oder GDF-5 und BMP Typ I Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen auch hier nicht gezeigt werden. Durch Expression von GDF-5 hingegen wird die Expression von Osteocalcin schwach induziert, welche durch die Expression von BMP Typ IA oder Typ IB Rezeptoren verstärkt wird. Hierbei kann in Kulturen, die sowohl GDF-5 als auch BMP Typ IA Rezeptoren exprimieren, eine weitaus stärkere Induktion an Osteocalcin als in GDF-5 und BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen gezeigt werden. Auch die Expression von Osteopontin in der GDF-5 abhängigen osteogenen Differenzierung wird durch BMP Typ I Rezeptoren induziert, wobei die rekombinante Expression von BMP Typ IA Rezeptoren eine leicht verstärkte Induktion zur Folge hat. Osteonectin weist in allen Zelllinien eine gleichermaßen induzierte Expression während der proliferativen Phase der Kultur auf. Schwach induziert wird auch durch rekombinante Expression von GDF-5 die Expression des PTH/PTHrP-Rezeptors, welche durch BMP Typ IB Rezeptoren deutlich gesteigert wird. Hinsichtlich Cbfa-1 weisen GDF-5 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine gesteigerte Expression während der frühen Kulturphase auf, welche in später Kultur abnimmt; ein vergleichbares Expressionsmuster zeigen parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die rekombinant BMP Typ IB Rezeptoren exprimieren (Abbildung 2.4.30). Hier kann durch rekombinante Expression von BMP Typ IA Rezeptoren eine deutliche Induktion von Cbfa-1 über den gesamten Kulturzeitraum beobachtet werden, während BMP Typ IB Rezeptoren nur zu einer mäßigen Induktion von Cbfa-1 beitragen.

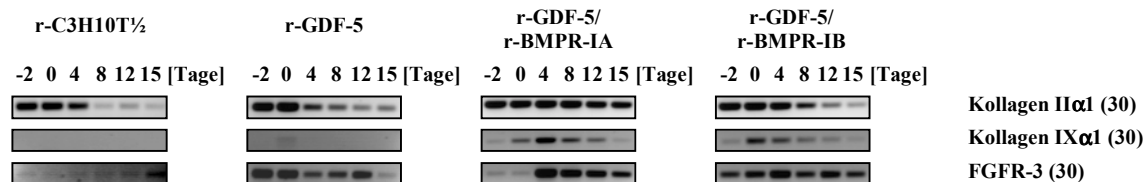
#### 2.4.7.1.2 Expressionsprofil chondrogener Markergene

C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die rekombinant GDF-5 exprimieren, weisen eine geringes chondrogenes Differenzierungspotential auf. Eine weitergehende Induktion chondrogener Markergene kann sowohl durch Expression von BMP Typ IA oder auch Typ IB Rezeptoren erzielt werden, wobei das chondrogene Potential in GDF-5 und BMP Typ IA Rezeptoren exprimierenden Zellen als ausgeprägter zu bewerten ist (Abbildung 2.4.35).

Rekombinant GDF-5 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen eine erhöhte Expression von Kollagen Typ II, welche durch Expression von BMP Typ IB Rezeptoren gesteigert werden kann. Die Expression von BMP Typ IA Rezeptoren hingegen führt zu einer deutlichen Induktion von Kollagen Typ II im gesamten Kulturzeitraum. Auch Kollagen Typ IX, welches in parentalen und GDF-5 exprimierenden Zellen nicht detektiert werden kann, wird durch



BMP Typ I Rezeptoren induziert, wobei die Induktion durch BMP Typ IA Rezeptoren eine stärkere ist. Ähnlich dem Expressionsprofil BMP Typ IB Rezeptor exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen weisen GDF-5 exprimierende Zellen eine erhöhte Expression an FGFR-3 auf, die in später Kulturphase wiederum abnimmt (Abbildung 2.4.31). Demgegenüber bleibt die Induktion durch Expression von BMP Typ IB Rezeptoren über den gesamten Kulturzeitraum erhalten. GDF-5 und BMP Typ IA Rezeptor exprimierende Zellen hingegen zeigen eine schwache Expression an FGFR-3 während der Proliferationsphase, aber eine deutlich verstärkte Expression in der weiterführenden Kultur.

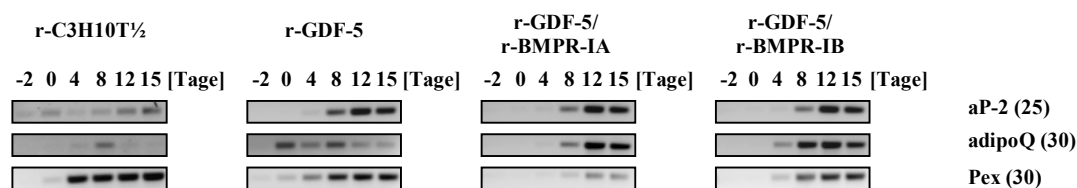


**Abbildung 2.4.35:** Expression chondrogener Markergene in der GDF-5 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

#### 2.4.7.1.3 Expressionsprofil adipogener Markergene und Pex-Expression

Sowohl die rekombinante Expression von GDF-5 als auch von GDF-5 und BMP Typ I Rezeptoren in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hat eine gesteigerte Differenzierung in die adipogene Entwicklungsrichtung zur Folge. Eine signifikante Steigerung oder Reduktion des adipogenen Potentials durch Expression von BMP Typ IA oder Typ IB Rezeptoren kann in der GDF-5 abhängigen Differenzierung nicht beobachtet werden (Abbildung 2.4.36).



**Abbildung 2.4.36:** Expression adipogener Markergene in der GDF-5 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

Durch Expression von GDF-5 in parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wird aP-2 in der späten Kulturphase verstärkt exprimiert. Das adipogene Markergen adipoQ wird mit dem Erreichen zellulärer Konfluenz induziert, zeigt aber in der späten Kulturphase eine reduzierte Expression. Die Induktion der aP-2 Expression kann durch rekombinante BMP Typ I Rezeptoren nicht gesteigert werden. Im Gegensatz zu GDF-5 exprimierenden Zellen weisen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, die GDF-5 und die entsprechenden BMP Typ I Rezeptoren rekombinant exprimieren, eine deutlich gesteigerte Expression in der späten Phase der Kultur auf, wobei eine verstärkte Induktion in den GDF-5 und BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen aufzuzeigen ist.

Die hohe Expression von Pex in parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche nach dem Erreichen der zellulären Konfluenz in der Differenzierungsphase einsetzt, wird durch die rekombinante Expression von GDF-5 nur schwach reprimiert; in der späten Kulturphase kann auch hier eine hohe Expression an Pex aufgezeigt werden. Die Repression der Pex Expression wird durch rekombinante BMP Typ IB Rezeptoren gesteigert, Pex wird in der später Kultur deutlich reduziert exprimiert. Eine klare Repression von Pex wird durch rekombinante Expression von BMP Typ IA Rezeptoren erzielt, hier ist in der späten Differenzierungsphase nur noch eine schwache Expression von Pex zu beobachten.

#### **2.4.7.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung GDF-5 exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen**

Übereinstimmend mit den Expressionsprofilen chondro-/osteogener Markergene zeigen rekombinant GDF-5 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen auch auf der Ebene histologischer Färbungen eine schwach ausgeprägte chondro-/osteogene Differenzierung. Die Expression von rekombinanten BMP Typ I Rezeptoren hat eine schwache Induktion des Differenzierungspotentials zur Folge (Abbildung 2.4.37).

Vergleichbar mit parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche BMP Typ IB Rezeptoren exprimieren (Kapitel 2.4.6.2), weisen auch GDF-5 exprimierende Zellen ein einschichtiges Wachstum auf. Auch hier können Alkalische Phosphatase positive Zellen ausgemacht werden, wobei die Bildung von chondrogener Matrix, distinkte Mineralisierungszonen und Zellen adipogenen Charakters nicht dargestellt werden können (Abbildung 2.4.37B/C/D).

Die Expression von BMP Typ I Rezeptoren in GDF-5 exprimierenden Zellen führt zunächst zu einer Änderung der Wachstumseigenschaften, die Zellen stellen nach Erreichen der Konfluenz ihr Wachstum nicht ein und weisen Zellen von heterogener Gestalt auf.

Zellen, die sowohl GDF-5 als auch BMP Typ IA Rezeptoren exprimieren, weisen neben Alkalischer Phosphatase auch Areale auf, in denen die Ausbildung chondrogener Matrix aufzuzeigen ist (Abbildung 2.4.37F/G). Die Einlagerung von Kalzium in Mineralisierungszonen kann nicht beobachtet werden (Abbildung 2.4.37H). Vereinzelt können Zellen adipogenen Charakters mit Einschlüssen von Lipiden ausgemacht werden (Abbildung 2.4.27M).



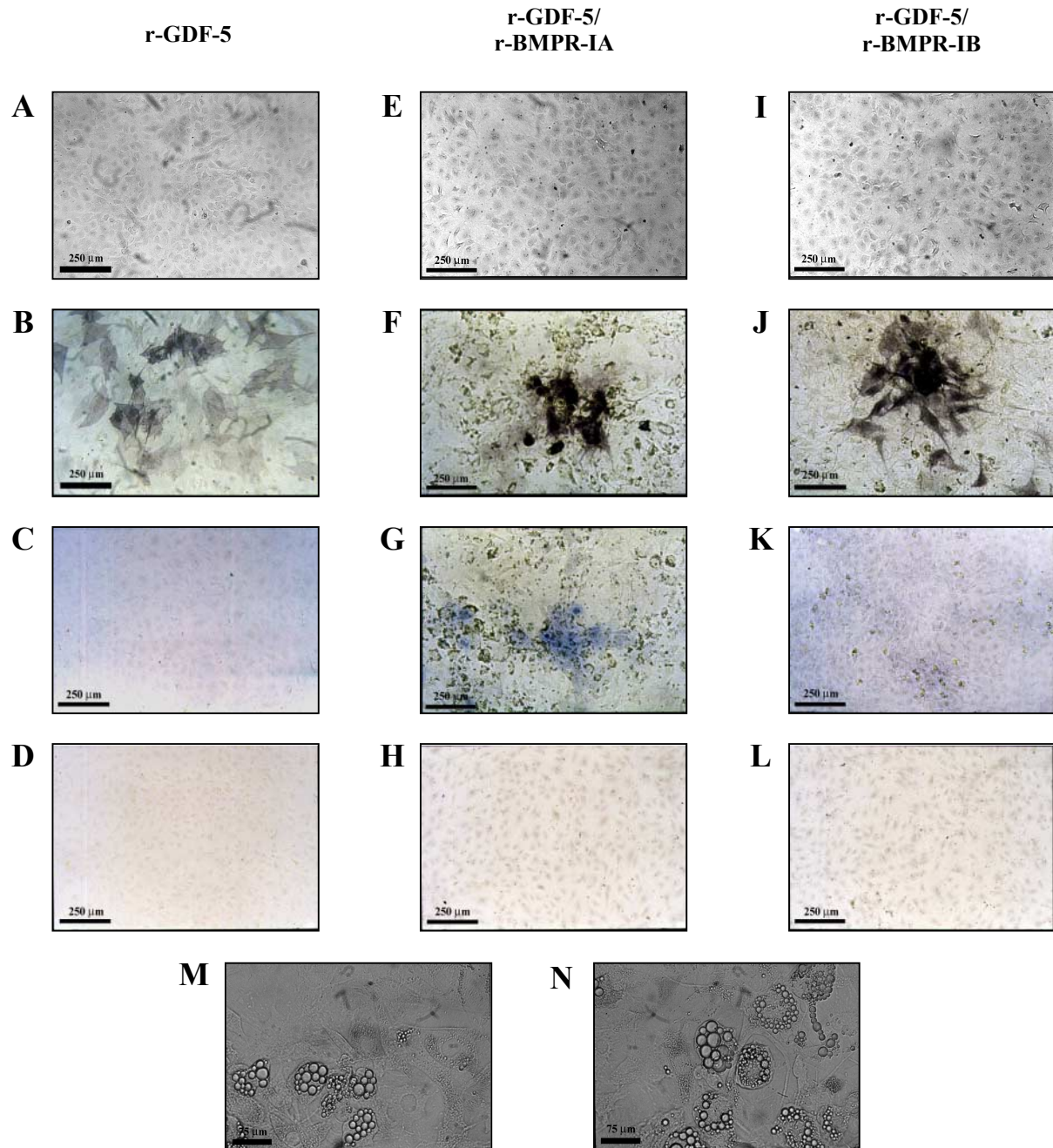
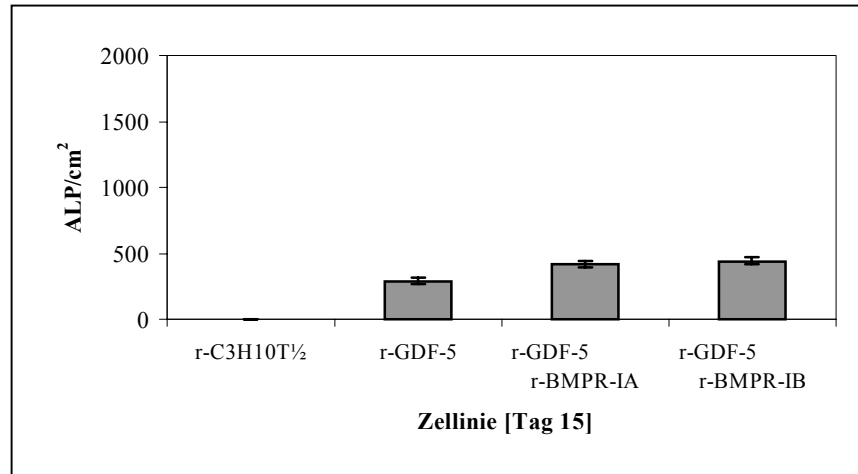


Abbildung 2.4.37: Morphologie und histologische Färbungen

- |                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| A r-GDF-5, Tag 0, PhaKo             | H r-GDF-5/r-BMPR-IA, Tag 15, von Kossa         |
| B r-GDF-5, Tag 15, ALP              | I r-GDF-5/r-BMPR-IB, Tag 0, PhaKo              |
| C r-GDF-5, Tag 15, Alcian           | J r-GDF-5/r-BMPR-IB, Tag 15, ALP               |
| D r-GDF-5, Tag 15, von Kossa        | K r-GDF-5/r-BMPR-IB, Tag 15, Alcian            |
| E r-GDF-5/r-BMPR-IA, Tag 0, PhaKo   | L r-GDF-5/r-BMPR-IB, Tag 15, von Kossa         |
| F r-GDF-5/r-BMPR-IA, Tag 15, ALP    | M r-GDF-5/r-BMPR-IA, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |
| G r-GDF-5/r-BMPR-IA, Tag 15, Alcian | N r-GDF-5/r-BMPR-IB, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |

Eine gesteigerte Expression an Alkalischer Phosphatase kann auch in den GDF-5 und BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen beobachtet werden (Abbildung 2.4.37J). Hierbei wird die Expression von Alkalischer Phosphatase sowohl durch BMP Typ IA als auch Typ IB Rezeptoren äquivalent induziert (Abbildung 2.4.38). Eine Ausbildung chondrogener Matrix oder von Mineralisierungszonen wird durch rekombinante BMP Typ IB Rezeptoren in GDF-5 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nur schwach oder nicht gefördert (Abbildung 2.4.37K/L), während in diesen Kulturen verstärkt Zellen adipogener Morphologie verzeichnet werden können (Abbildung 2.4.37N).



**Abbildung 2.4.38:** Alkalische Phosphatase-positive Zellen in der GDF-5 abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die Bestimmung der Anzahl an Alkalische Phosphatase-positiven Zellen erfolgte über dreimaliges Auszählen der jeweiligen Kulturen. Dargestellt ist die Anzahl positiv gefärbter Zellen im Mittel und die korrespondierende Standardabweichung.

Die rekombinante Expression von GDF-5 in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt zu einer schwachen chondro-/osteogenen Differenzierung. Eine Induktion des Differenzierungspotentials kann durch gleichzeitige Expression von BMP Typ I Rezeptoren erzielt werden. Obwohl GDF-5 den prädominanten Liganden der BMP Typ IB Rezeptoren darstellt, kann in den entsprechenden Kulturen nur ein vergleichsweise schwaches chondro-/osteogenes Potential festgestellt werden.

Offenbar weisen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen einen BMP Typ IB Rezeptor-abhängigen Signalweg auf, welcher allerdings durch GDF-5 nur schwach angesprochen wird.

## 2.4.8 Einfluß von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren auf die chondro-/osteogene Differenzierung von parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

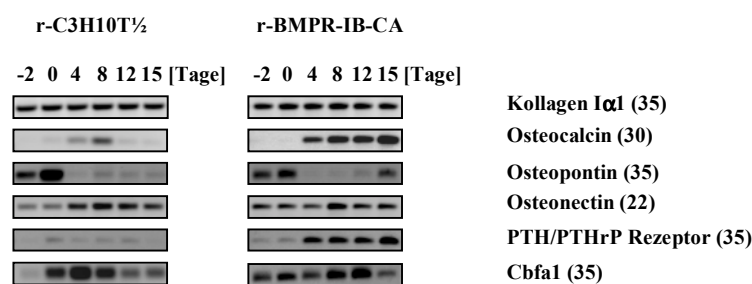
Durch die Expression von BMP Typ IB Rezeptoren und deren bevorzugten Liganden GDF-5 konnte nur ein schwach ausgeprägtes Differenzierungspotential für den Typ IB Rezeptor abhängigen Signalweg in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen aufgezeigt werden.

Zum deutlichen Nachweis eines aktiven Typ IB Rezeptor Signalweges wurden BMP Typ IB Rezeptoren generiert, die durch Punktmutation in der Aktivierungsdomäne (GS-Box) eine konstitutive Aktivität aufweisen. Diese Rezeptoren zeigen losgelöst von Liganden und Transphosphorylierung durch Typ II Rezeptoren eine permanente Aktivierung der intrazellulären Kinasedomäne.

### 2.4.8.1 Expression von chondro-/osteogenen und adipogenen Markergenen in konstitutiv-aktive BMPR-IB exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

#### 2.4.8.1.1 Expressionsprofile osteogener Markergene

Die Expression von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren in parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt zu einer deutlichen Induktion osteogener Markergene (Abbildung 2.4.39). So werden Osteocalcin und der PTH/PTHrP-Rezeptor ab dem Tag 4 nach Erreichen zellulärer Konfluenz verstärkt exprimiert. Auch Cbfa-1 weist eine verstärkte Expression im gesamten Kulturzeitraum auf, wobei am Tag 15 eine schwächere Expression detektiert wird. Ein biphasisches Expressionsprofil kann für Osteopontin aufgenommen werden, welches ähnlich den parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in der proliferativen Phase der Kultur exprimiert wird. Hier kann in der späten Phase der Kultur eine Induktion der Expression aufgezeigt werden. Die Expression der osteogenen Markergene Kollagen Typ I und Osteonectin wird nicht oder kaum durch konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren moduliert.



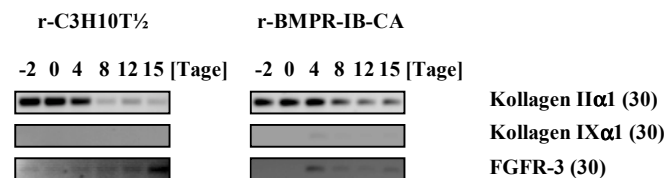
**Abbildung 2.4.39:** Einfluß von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren auf die Expression osteogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren osteogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

### 2.4.8.1.2 Expressionsprofile chondrogener Markergene

Im Gegensatz zu den Expressionsprofilen osteogener Markergene werden die chondrogenen Markergene FGF-Rezeptor 3, Kollagen Typ II und Typ IX in konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kaum reguliert (Abbildung 2.4.40).

Die Expression von Kollagen Typ II wird in der mittleren und späten Kulturphase schwach induziert, während für Kollagen Typ IX keine Induktion ausgemacht werden kann. Auch die Expression von FGFR-3 wird nicht induziert; hier ist ähnlich wie in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nur eine schwache Expression ab dem Tag 4 zu beobachten.



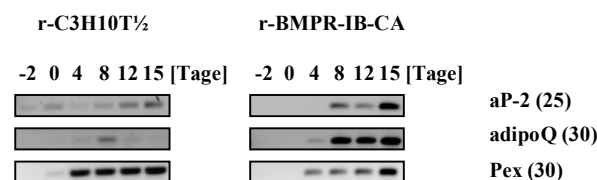
**Abbildung 2.4.40:** Einfluß von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren auf die Expression chondrogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren chondrogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

### 2.4.8.1.3 Expressionsprofile adipogener Markergene und Pex-Expression

Die adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ werden im Zuge der Differenzierung von konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen deutlich induziert (Abbildung 2.4.41). Eine gesteigerte Expression adipogener Markergene kann für adipoQ ab Tag 4 und für aP-2 ab dem Tag 8 der Kultur nachgewiesen werden.

Die Expression von Pex weist ein mit parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen vergleichbares Expressionsprofil auf. Obwohl die Expression von Pex in konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen schwach reprimiert wird, kann hier eine deutliche Expression ab dem Tag 4 ausgemacht werden. Die Expression bleibt über den übrigen Kulturzeitraum konstant und erfährt in später Kulturphase am Tag 15 erneut eine Induktion.



**Abbildung 2.4.41:** Einfluß von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren auf die Expression adipogener Markergene in der Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die hier eingesetzten Oligonukleotide zum spezifischen Amplifizieren adipogener Markergene sind dem Kapitel 7.1.3 zu entnehmen. Als Standardreaktion wurde 1  $\mu$ l cDNA bei angegebener Zykluszahl verwendet.

#### 2.4.8.2 Histologische Färbungen zur chondro-/osteogenen Differenzierung konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die rekombinante Expression von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt nach Analyse der Expression chondro-/osteogener Markergene zu einer bevorzugten Induktion der osteogenen Differenzierung. Neben einem schwachen chondrogenen Potential kann eine Induktion der adipogenen Differenzierung beobachtet werden. Auch durch histologische Färbungen kann eine deutliche Bevorzugung der osteogenen Differenzierung bestätigt werden, während die Ausprägung chondrogener Differenzierungszentren eine geringe ist (Abbildung 2.4.42).

C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren exprimieren, stellen ihre Vermehrung mit dem Erreichen zellulärer Konfluenz nicht ein. Die Kultur stellt sich als sehr heterogen hinsichtlich der Morphologie dar und wächst vielschichtig als „*Multilayer*“. Neben typischen fibroblastoiden Zellen können in verstärktem Maße stellare und Lipidtröpfchen beinhaltende Zellen (Abbildung 2.4.42 F) beobachtet werden.

Zellen chondroiden Erscheinungsbildes können nur vereinzelt beobachtet werden.

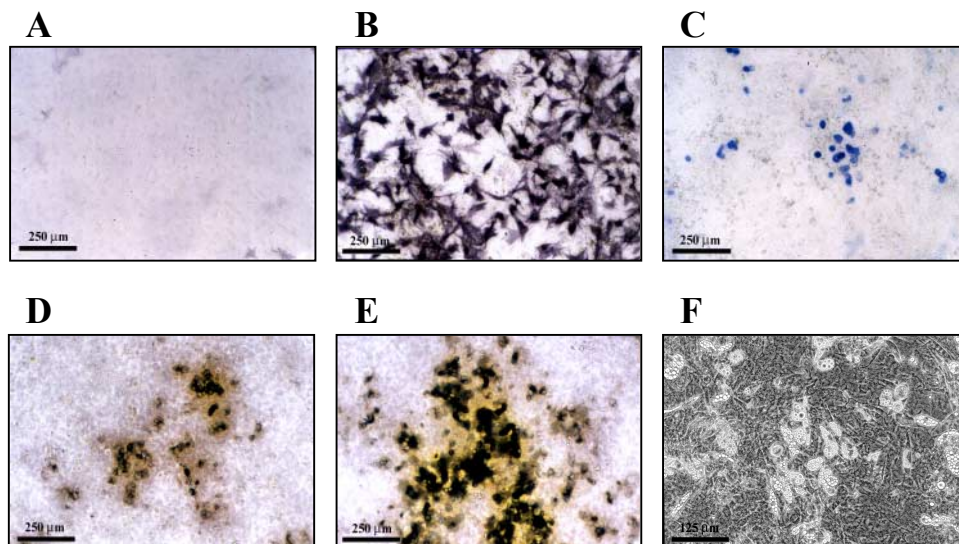


Abbildung 2.4.42: Morphologie und histologische Färbungen

- |                                |   |
|--------------------------------|---|
| A r-BMPR-IB-CA, Tag 0, ALP     | D r-BMPR-IB-CA, Tag 15, von Kossa         |
| B r-BMPR-IB-CA, Tag 15, ALP    | E r-BMPR-IB-CA, Tag 15, von Kossa         |
| C r-BMPR-IB-CA, Tag 15, Alcian | F r-BMPR-IB-CA, Tag 15, Adipozyten, PhaKo |

Bereits nach dem Erreichen zellulärer Konfluenz am Tag 0 der Differenzierungskultur kann vereinzelt eine schwache Expression an Alkalischer Phosphatase beobachtet werden, welche bis zum Ende der Kultur kontinuierlich gesteigert wird (Abbildung 2.4.42A/B). Ein Quantifizieren der Zahl Alkalische Phosphatase exprimierender Zellen durch Auszählen positiv gefärbter Zellen ist aufgrund des vielschichtigen Wachstums und der ausgeprägten Färbung nicht mehr möglich. Im Vergleich mit den übrigen hier beschriebenen Kulturen sollte von einer weitaus stärksten Induktion an Alkalischer Phosphatase ausgegangen werden.

Einhergehend mit der Expression von Alkalischer Phosphatase können in der späten Kulturphase ausgeprägte Mineralisierungszonen angefärbt werden (Abbildung 2.4.42D). Obwohl die Anfärbung eingelagerten Kalziums in der Abbildung 2.4.42E nicht repräsentativ für die hier vorliegende Kultur ist, zeigt sich deutlich das Mineralisierungspotential konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen.

Eine Färbung von Proteoglykanen als Bestandteil chondrogener Matrix kann bei vereinzelten Zellen beobachtet werden (Abbildung 2.4.42C). Chondrogene Differenzierungskeime oder flächige Areale chondrogener Matrix können hier nicht ausgemacht werden.

Die Überexpression konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt prädominant zu einer ausgeprägten Induktion des osteogenen Differenzierungspotentials, welches durch histologische Färbungen und verstärkter Expression osteogener Markergene aufgezeigt werden kann. Das chondrogene Potential von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hingegen wird durch konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren kaum gefördert.

C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen weisen einen durchaus aktiven BMP Typ IB Rezeptor abhängigen Signalweg auf, welcher deutlich der Ausprägung der osteogenen Differenzierungsrichtung zuzuordnen ist.



### 3 Diskussion

#### 3.1 Bone Morphogenetic Protein-2 abhängige Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T½

Die murine Vorläuferzelllinie C3H10T½ repräsentiert ein relativ frühes Stadium der mesenchymalen Zelldeterminierung [Reznikoff, 1973]. Ursprünglich einen undifferenzierten, fibroblastoiden Charakter aufweisend verfügt diese Zelllinie über das Potential unter geeigneten Kulturbedingungen in distinkte mesenchymale Zellpopulationen wie Adipozyten, Chondrozyten und Myoblasten zu differenzieren [Taylor, 1991]. Diese Fähigkeit zur pluripotenten Differenzierung und ein äußerst sensitives Reagieren auf Stimulation mit Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF-β Superfamilie schaffen mit dieser Vorläuferzelllinie ein geeignetes zelluläres Modell zur Untersuchung von Differenzierungsfaktoren und deren Signalweiterleitung in der frühen Entwicklung mesenchymaler Zelltypen.

Eine wichtige Rolle in frühen Induktions- und Differenzierungsprozessen von mesenchymalen Geweben spielen die Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) als Wachstums- und Differenzierungsfaktoren der TGF-β Superfamilie [Lyons, 1991; Hogan, 1996; Graff, 1997]. Im Hinblick auf die frühe Knochen- und Knorpelentwicklung konnten zunächst für bestimmte BMPs osteoinduktive Eigenschaften *in vivo* mittels Transplantationsexperimenten aufgezeigt werden [Urist, 1965/1983]. In zellulären Differenzierungssystemen konnte mittlerweile eine Reihe von Studien das Potential von BMP-2 als prominentes Mitglied der BMP-Familie zur osteogenen Induktion prädeterminierter osteogener und nicht-osteogener Zelllinien darlegen [Hiraki, 1991; Chen, 1991; Takuwa, 1991; Thies, 1992; Katagiri, 1994].

In C3H10T½-Zellen führt die rekombinante Expression oder Stimulation mit BMP-2 zur Initiation und Ausprägung der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung *in vitro* [Wang, 1993; Ahrens, 1995; Denker, 1999].

Zum Evaluieren der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T½-Zellen wurde ein bicistronischer Expressionsvektor zur rekombinanten Expression von humanem BMP-2 und eines β-Galaktosidase/Neomycin Fusionsproteins konstruiert und stabil in das Genom der C3H10T½-Zellen transfiziert (Kapitel 2.1/2.2). Anhand von 15-tägigen Differenzierungskulturen sowie anschließender Analyse der Genexpressionsmuster und histologischer Färbungen konnte das von Ahrens, 1995 etablierte BMP-2 abhängige Differenzierungssystem verifiziert werden (Kapitel 2.4.2).

Zum Aufzeigen des osteogenen Potentials wurden hierbei die Expressionsprofile der osteogenen Markergene Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, PTH/PTHrP-Rezeptor und Cbfa-1 aufgenommen (Kapitel 2.4.2.1.1). Weiterhin wurde die osteogene Differenzierung der C3H10T½-Zellen durch histologische Färbung von Alkalische Phosphatase exprimierenden Zellen und distinkten Mineralisierungszonen angezeigt (Kapitel 2.4.2.2).

Das chondrogene Differenzierungspotential von C3H10T½-Zellen wurde durch Alcian Blau Färbung von Proteoglykanen als Komponente der Knorpelmatrix histologisch und durch Analyse von Expressionsmustern der chondrogenen Markergene Kollagen Typ II und Typ IX sowie des FGF-Rezeptor 3 aufgezeigt (Kapitel 2.4.2.1.2/2.4.2.2).

Das adipogene Potential respektive ausgebildete Adipozyten konnten anhand ihrer charakteristischen Morphologie und durch die Induktion der adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ bestimmt werden (Kapitel 2.4.2.1.3/2.4.2.2).

Im Gegensatz zu parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen rekombinant BMP-2 exprimierende Zellen neben der adipo-, chondro- und osteogenen Differenzierung eine erhöhte Teilungsaktivität. Während parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen mit dem Erreichen der zellulären Konfluenz ihr Wachstum einstellen, zeigen rekombinant BMP-2 exprimierende Zellen ein mehrschichtiges Wachstum (Kapitel 2.4.2.2). Der positive Einfluß von BMP-2 auf die Zellproliferation mag auf eine reduzierte Kontaktinhibition von osteogenen und adipogenen Vorläuferzellen zurückzuführen sein [Wang, 1993]. Annehmend, daß Osteoblasten und Adipozyten aus einem gemeinsamen Vorläufer hervorgehen [Bennet, 1991], wäre die erhöhte Teilungsaktivität der BMP-2 exprimierenden Zellen eher von einer Art klonaler Amplifikation osteogen und/oder adipogen determinierter Zellpopulationen denn von einer allgemeinen Stimulation der Proliferation abzuleiten.

Die Induktion osteogener Markergene, insbesondere PTH/PTHrP-Rezeptor, Osteopontin und Osteocalcin, die erhöhte Expression an Alkalischer Phosphatase und die Ausbildung von distinkten Mineralisierungszentren in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen deutlich eine Differenzierung in die osteogene Entwicklungsrichtung an (Abbildung 2.4.2/2.4.6). Demgegenüber wird in rekombinant BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen das osteogene Markergene Kollagen Typ I nur marginal reguliert. In Osteoblastenkulturen wird das fibrilläre Kollagen Typ I, welches den Hauptanteil der kollagenen Knochenmatrix darstellt, während der Proliferationsphase exprimiert [Robey, 1989]. In fibroblastoiden Zellen und in Präosteoblasten hingegen findet sich, vergleichbar mit BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, eine schwache Expression von Kollagen Typ I, welche über den gesamten Kulturzeitraum bestehen bleibt und durch die Stimulation der Zellen mit BMP-4 erhöht werden kann [Zhou, 1993]. Eine BMP-abhängige Induktion des osteogenen Transkriptionsfaktors Cbfa-1 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -, MC3T3-E1- oder C2C12-Zellen konnte für BMP-7 oder BMP-4/BMP-7 Heterodimere, nicht aber für BMP-2 gezeigt werden [Ducy, 1997; Tsuji, 1998]. Die Expressionsprofile von Cbfa-1 in den untersuchten Kulturen lassen keine eindeutige Regulation hinsichtlich eines BMP2- abhängigen Induktionsverhaltens von Cbfa-1 erkennen (Abbildung 2.4.2/7/13/24/30/39).

Die BMP2-abhängige Initiation der Chondrogenese wird durch die Induktion der chondrogenen Markergene FGF-Rezeptor 3, Kollagen Typ II und Kollagen Typ IX sowie durch histologische Färbung von Proteoglykanen dokumentiert (Abbildung 2.4.3/2.4.6). Hierbei stellen die Kollagene Typ II und Typ IX wichtige Bestandteile der kollagenen Knorpelmatrix dar [Eyre, 1987; Robey, 1989], während FGF-Rezeptor 3 während der Embryonalentwicklung in proliferierenden und ruhenden Chondrozyten der Wachstumszone exprimiert wird [Peters, 1993]. In C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ist die rekombinante Expression von FGFR-3 ausreichend, um eine Differenzierung in die chondrogene Entwicklungsrichtung zu initiieren [Dissertation S. Czichos, TU-Braunschweig, nicht publiziert].

Die Rolle von BMPs in der Adipogenese ist nicht eindeutig geklärt. Es werden hierbei sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte von BMPs diskutiert; so stimuliert beispielsweise BMP-2 die adipogene Differenzierung von aus Kalvarien abgeleiteten 2T3-Zellen, während eine Inhibition der Adipogenese in Stromazellen des Knochenmarks beobachtet werden kann [Gimble, 1995; Lehmann, 1997; Chen, 1998]. In C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kann eine deutliche Stimulation der Adipogenese aufgrund rekombinanter Expression von BMP-2 anhand der morphologischen Ausprägung von Adipozyten und durch Induktion der adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.3/2.4.6).



Als Rezeptoren der BMP-2 abhängigen Differenzierung entlang der adipogenen, chondrogenen und osteogenen Entwicklungsrichtung konnten auf zellulärer Ebene membranständige Rezeptorkinasen mit Serin/Threonin-Aktivität aufgezeigt werden, die nach Bindung von BMP das entsprechende Signal über intrazelluläre Mediatoren der Smad-Familie oder durch Aktivierung weiterer Signalwege in den Zellkern zur Transkription BMP-2 induzierter Gene weiterleiten [Baker, 1997; Kawabata, 1998; Miyazono, 1999]. Obgleich eine Vielzahl an BMP-Rezeptoren und intrazellulären Mediatoren kloniert und charakterisiert werden konnte, ist ihr Wirken und Zusammenspiel in BMP-2 abhängigen Differenzierungsprozessen weitgehend ungeklärt.

Wie in der Abbildung 2.4.1 dargestellt, weisen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine inhärente Expression der Komponenten der BMP-abhängigen Signalkaskade auf. So wird GDF-5 und BMP-4 im gesamten Kulturzeitraum exprimiert, während BMP-2 und BMP-7 nicht detektiert werden können. Auf Ebene der Rezeptorkinasen kann eine permanente Expression an BMP-2 bindenden Rezeptoren beobachtet werden; in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden ActR-I, BMPR-IA, ActR-II und BMPR-II im gesamten Kulturzeitraum moderat exprimiert, während für BMPR-IB und ActR-IIB eine schwache Expression gezeigt werden kann. Ebenso wird mit Ausnahme von Smad-6 die Expression von intrazellulären Mediatoren der Smad-Familie (hier: Smad-1 bis Smad-7) im Kulturzeitraum detektiert.

Die inhärente Expression von Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie, deren Rezeptoren und intrazellulären Signalmolekülen ermöglicht den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ein Reagieren auf entsprechende Stimulatoren mesenchymaler Differenzierung [Gazit, 1993].

### 3.2 BMP Typ I Rezeptoren in der BMP-2 abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Wie im vorangehenden Kapitel dargestellt führt die rekombinante Expression von BMP-2 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zur Differenzierung entlang der chondro-/osteogenen Entwicklungslinie.

Die Weiterleitung des extrazellulären BMP-2 Signals erfolgt über membranständige Rezeptoren mit Serin-/Threonin-Kinaseaktivität, von denen mehrere als mögliche Bindungspartner für BMP-2 angenommen werden (Abbildung 3.1).

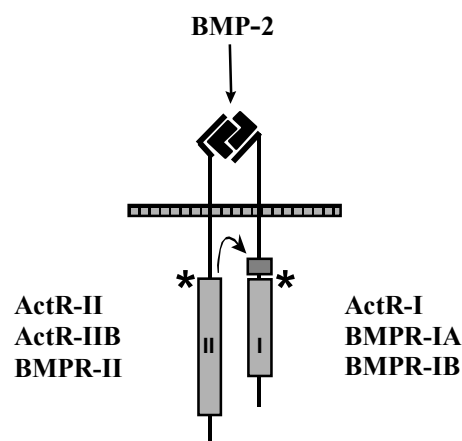


Abbildung 3.1: Bindung von BMP-2 durch Rezeptoren der TGF- $\beta$  Superfamilie [Yamashita, 1996]

Die rekombinante Expression von parentalen, funktionellen BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren und deren dominant-negative Versionen (BMPR-IA-DN und BMPR-IB-DN) in BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt zu einer vom jeweiligen BMP Typ I Rezeptor abhängigen Modulation der durch BMP-2 vermittelten chondro-/osteogenen Differenzierung (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1:** Regulation chondro-/osteogener Markergene und histologische Bewertung der BMP Typ I Rezeptor abhängigen Differenzierung

Markergen / Zelllinie	r-BMP-2 r-BMPR-IA	r-BMP-2 r-BMPR-IA-DN	r-BMP-2 r-BMPR-IB	r-BMP-2 r-BMPR-IB-DN
Alkalische Phosphatase	↑↑	↓	↑	-
Cbfa-1	-	-	-	-
Kollagen Typ I	-	-	-	-
Osteocalcin	-	↓	↑	-
Osteonectin	-	-	-	-
Osteopontin	↓	↓	-	-
PTH/PTHrP-Rezeptor	-	↓	-	-
von Kossa	↑	↓	-	-
Kollagen Typ II	-	↓	-	-
Kollagen Typ IX	↑	↓	↑	↑
FGF-Rezeptor 3	-	-	-	-
Alcian Blau	↑↑	↓	↓	-

- keine Regulation relativ zu r-BMP-2; ↓ Repression relativ zu r-BMP-2;  
 ↑/↑↑ Induktion relativ zu r-BMP-2

Die Expression funktioneller BMP Typ I Rezeptoren führt zu einer Verstärkung der BMP-2 abhängigen Differenzierung (Kapitel 2.4.3). Hierbei wird die Expression spezifischer chondro-/osteogener Markergene durch Überexpression funktioneller BMP Typ I Rezeptoren nur marginal reguliert. Die histologische Beurteilung anhand spezifischer Färbungen zeigt allerdings deutlich, daß die BMP-2 vermittelten Effekte durch BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren verstärkt werden, wobei die Expression von BMP Typ IA Rezeptoren zu einer prädominanten Erhöhung des BMP-2 abhängigen chondrogenen Potentials führt, welches sich in einer ausgeprägten chondroiden Morphologie und gesteigerter Produktion chondrogener Matrix widerspiegelt (Abbildung 2.4.10). Hingegen führt die Expression von funktionellen BMP Typ IB Rezeptoren zu einer gesteigerten BMP-2 abhängigen osteo- und adipogenen Differenzierung. Dieses wird durch eine schwächere Färbung chondrogener Matrixbestandteile, die Induktion von Alkalischer Phosphatase, eine eher stellare, osteoblastoide Morphologie der Zellen (Abbildung 2.4.10) und durch die Induktion adipogener Markergene dokumentiert (Abbildung 2.4.9).

Demgegenüber führt die Expression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren zu einer vollständigen Blockierung der BMP-2 vermittelten chondro-/osteogenen Differenzierung. Sowohl auf der Ebene der Histologie als auch der Genexpression werden BMP-2 abhängige Signale signifikant reprimiert. So können nach 15tägiger Differenzierungskultur nur vereinzelt Alkalische Phosphatase-positive Zellen ausgemacht werden, während eine chondroide Matrix oder auch Mineralisierungszonen nicht zu detektieren sind (Abbildung 2.4.16). Auch werden durch BMP-2 induzierte chondro-/osteogene Markergene wie Osteocalcin, Osteopontin, PTH/PTHrP-Rezeptor, Kollagen Typ II und Typ IX durch Expression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren reprimiert (Kapitel 2.4.4.1). Ein Einfluß auf die adipogene Differenzierung kann anhand der Morphologie oder der Expression von adipogenen Markergenen nicht beobachtet werden.

Die durch BMP-2 vermittelte chondro-/osteogene Differenzierung wird durch die Expression von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren nicht beeinflusst (Kapitel 2.4.4).

Im Gegensatz zu dem *in vitro*-Verhalten zeigen dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren in ektopischen Transplantationsexperimenten einen interessanten Effekt hinsichtlich der BMP-2 induzierten Knochenbildung. Während BMP-2 exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vivo* ektopisch Knochenstrukturen im Sinne der endochondralen Ossifikation mit Ausprägung reifender und hypertropher Chondrozyten ausbilden, behalten BMP-2 und dominant-negative Typ IA Rezeptoren exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vivo* einen undifferenzierten Status bei. BMP-2 und dominant-negative Typ IB Rezeptoren exprimierende Zellen initiieren die chondro-/osteogene Differenzierung *in vivo*, aber eine Verknöcherung kann nicht beobachtet werden. Die osteogene Reifung im Zuge der BMP-2 induzierten ektopischen Knochenbildung wird reprimiert; die osteogene Entwicklung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vivo* verbleibt hier im hypertrophen Status (Kapitel 2.4.4.5).

Demzufolge käme den BMP Typ IA Rezeptoren eine wichtige Rolle in der BMP2-abhängigen Induktion früher chondro-/osteogener Strukturen zu, während BMP Typ IB Rezeptoren eher in der osteogenen Reifung relevant zu sein scheinen.

Auch *in situ* Hybridisierungen für BMP Typ I Rezeptoren im sich entwickelnden Mausembryo zeigen eine nahezu ubiquitäre Expression von BMP Typ IA Rezeptoren, während Typ IB Rezeptoren eine spatial eher restriktive Expression aufweisen. In den sich entwickelnden Knochenstrukturen konnte eine kongruente Expression von BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren ausgemacht werden [Dewulf, 1995]. So werden in frühen mesenchymalen Kondensationen, die später zu Skelettknochen und cranio-facialen Strukturen differenzieren, sowohl BMP Typ IA als auch Typ IB Rezeptoren exprimiert. Ähnliche Muster können sowohl in ruhenden und reifenden Chondrozyten als auch in Osteoblasten ausgemacht werden, wohingegen im Perichondrium des sich entwickelnden Knorpels BMP Typ IB, nicht aber Typ IA Rezeptoren detektiert werden [Ishidou, 1995]. Konträr zu unseren *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnte mittels dominant-negativer BMP Typ I Rezeptoren im *in vivo* Hühnchen-Modell gezeigt werden, daß in mesenchymalen Kondensationen die frühe Initiation der chondrogenen Entwicklung von BMP Typ IB Rezeptoren abhängig ist, während BMP Typ IA Rezeptoren eher die Reifung von Chondrozyten beeinflussen. Im gleichen Modellsystem führt die Expression konstitutiv-aktiver BMP Typ IA oder Typ IB Rezeptoren Liganden-unabhängig zu einer verstärkten Ausbildung chondrogener Strukturen, wobei im Gegensatz zu Typ IB Rezeptoren die Expression von aktivierten Typ IA Rezeptoren zu einer verminderten Differenzierung in reife, hypertrophe Chondrozyten führt [Kawakami, 1996; Zou, 1997]. Eine putativ BMP-abhängige Initiation solcher mesenchymaler Kondensationen mit nachfolgender chondrogener Entwicklung sowohl über BMP Typ IA als auch über Typ IB Rezeptoren wird durch die Expression von BMP-2 in angrenzenden mesenchymalen Strukturen ermöglicht [Rosen, 1996].

In unreifen und reifenden Chondrozyten ist eine kongruente Expression von BMP-2, BMP-4 und BMP-7 mit BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren zu detektieren [Yazaki, 1998].

Weitere Einblicke in die Abhängigkeit der chondrogenen Induktion von BMP Typ I Rezeptoren konnten durch Nullmutationen von BMP Typ I Rezeptoren (BMPIA<sup>-/-</sup> und BMPIB<sup>-/-</sup>) im Mausmodell gewonnen werden. Während Nullmutationen des BMP Typ IA Rezeptors letal sind und bereits Defekte in der Mesoderminduktion aufweisen [Mishina, 1995], sind Nullmutationen des BMP Typ IB Rezeptors vital. Hier können Defekte hinsichtlich der Proliferation und Differenzierung chondrogener Zellen ausgemacht werden, so daß BMP Typ IB Rezeptor vermittelte Signale wohl eher nach der Determinierung und Initiation der chondrogenen Entwicklung zum Tragen kommen [Yi, 2000].

Inwieweit allerdings *in vivo* chondrogene Induktionen und Differenzierungsereignisse letztendlich BMP- respektive BMP2-abhängig sind und somit über distinkte Rezeptorkomplexe initiiert werden, bleibt unklar. Vielmehr scheinen die sich entwickelnden Knochen- und Knorpelstrukturen sowohl von der spatialen und temporären Expression der betreffenden Rezeptoren als auch von der sequentiellen Expression verschiedener BMPs abhängig zu sein, die im fein abgestimmten Zusammenspiel die Entwicklung reifen Knochens und Knorpels regulieren [Lyons, 1989b; Horton, 1993].

Die Verwendung von eher definierten zellulären Systemen zum Evaluieren BMP-abhängiger oder BMP-Rezeptorkomplex abhängiger chondro-/osteogener Differenzierung stellt sich ebenfalls kontrovers dar.

BMP-2 induziert je nach Kulturbedingungen die Differenzierung von immortalisierten 2T3-Zellen aus Mauskalvarien in die osteogene oder adipogene Entwicklungsrichtung [Ghosh-Choudhury, 1996]. Ähnlich den Befunden in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen konnte auch hier durch Verwendung dominant-negativer und konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren gezeigt werden, daß die BMP2-abhängige osteogene Differenzierung dieser Zellen über den BMP Typ IB Rezeptor vermittelt wird. Hier zeigt der BMP Typ IA Rezeptor keinen Einfluß auf das osteogene, aber auf das adipogene BMP2-abhängige Differenzierungspotential [Chen, 1998]. C3H10T $\frac{1}{2}$ - und 2T3-Zellen entstammen ursprünglich unterschiedlichen Zellpopulationen differierenden Entwicklungspotentials; während 2T3-Zellen einem eher osteoblastoiden Typus zuzuordnen sind, weisen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eher einen chondro- und osteoblastoiden Charakter auf. Das differierende Potential und der jeweilige Entwicklungsstatus der beiden Zelllinien spiegelt sich auch in der inhärenten Rezeptorausstattung wider, so exprimieren 2T3-Zellen sowohl BMP Typ IA als auch Typ IB Rezeptoren, wobei der Typ IA Rezeptor im Zuge der Differenzierung durch BMP-2 reprimiert wird. Hingegen exprimieren C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen prädominant BMP Typ IA Rezeptoren; eine Regulation der inhärenten Rezeptorexpression konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 2.4.1).

Die Abhängigkeit des chondro-/osteogenen Potentials vom jeweiligen Entwicklungsstatus und von der Rezeptorausstattung, spricht von der entwicklungsbiologischen Determination der Zelllinien wird anhand nicht-transformierter MC3T3-E1 Zellen aus neonatalen Mauskalvarien deutlich. MC3T3-Zellen werden durch BMP-2 zur verstärkten Differenzierung in die osteogene Entwicklungsrichtung stimuliert, welches allerdings durch die Verwendung dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren unterbunden werden kann [Suzawa, 1999]. Ähnlich den C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen weisen MC3T3-E1 prädominant eine inhärente Expression an BMP Typ IA Rezeptoren auf, während hier BMP Typ IB Rezeptoren nicht detektiert werden können. In dieser Arbeit konnte weiterhin gezeigt werden, daß die BMP2-abhängige Induktion von Alkalischer Phosphatase als Marker der osteogenen Differenzierung in murinen Knochenmarkzellen und in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen durch lösliche BMP Typ IA Rezeptoren inhibiert wird.

Neben den induktiven Eigenschaften auf osteogen determinierte Zellen können in myogen determinierten Zellen und im Muskelgewebe osteoinduktive Eigenschaften von BMP-2 beobachtet werden. So wird die myogene Zelllinie C2C12 durch BMP-2 in die osteogene Entwicklungsrichtung konvertiert [Katagiri, 1994], wobei durch BMP-2 die muskelspezifischen Transkriptionsfaktoren MyoD und Myogenin supprimiert werden [Katagiri, 1997]. Die BMP2-abhängige Konvertierung zur osteogenen Differenzierung wird auch hier durch dominant-negative BMP Typ IA und nicht durch dominant-negative Typ IB Rezeptoren unterbunden [Namiki, 1997], während konstitutiv-aktive BMP Typ I Rezeptoren BMP2-unabhängig zu einer Promotion der osteogenen Entwicklung führen [Akiyama, 1997]. Analog zu den endogenen Expressionsmustern von BMP Typ I Rezeptoren in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden in C2C12-Zellen BMP Typ IB Rezeptoren nur sehr schwach exprimiert.

Die BMP2-abhängige Differenzierung entlang der osteogenen Entwicklungsrichtung in osteogen und nicht-osteogen determinierten Zelllinien (MC3T3-E1, C2C12, C3H10T $\frac{1}{2}$  und 2T3) wird durch BMP Typ I Rezeptoren vermittelt, wobei die Abhängigkeit dieses Potentials von BMP Typ IA oder Typ IB Rezeptoren je nach Entwicklungsstatus und inhärenter Rezeptorausstattung der jeweiligen Zelllinien variiert. Welche BMP Typ I Rezeptorkomplexe letztendlich zur Weiterleitung der induktiven BMP-2 Signale ausgebildet und aktiviert werden, mag bereits determiniert sein. Diese prinzipielle Bevorzugung eines distinkten Signalweges scheint demnach auf das den Zellen innewohnenden Entwicklungspotential zu beruhen; ausgehend von der spatialen und temporären Expression von BMP Rezeptoren und deren Liganden während der chondro-/osteogenen Embryonalentwicklung mögen bestimmte Zelllinien distinkte Stadien dieser Differenzierung mit determinierten Expressionsmustern an Signalmolekülen und -wegen repräsentieren.

Die bereits vorhandene Determinierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hinsichtlich der BMP Rezeptorkomplexe zeigt sich anhand der Differenzierungsstudien von rekombinant BMP Typ I Rezeptor exprimierenden, parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen (Kapitel 2.4.5/2.4.6).

Die Expression von funktionellen BMP Typ I Rezeptoren in parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt sowohl im Fall des BMP Typ IA als auch des BMP Typ IB Rezeptors zu einer Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung, welche mit der Expression an Alkalischer Phosphatase und der Induktion von chondro-/osteogenen Markergenen wie Osteocalcin, PTH/PTHrP-Rezeptor, Kollagen Typ II und des FGF-Rezeptors-3 einhergeht (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Regulation chondro-/osteogener Markergene und histologische Bewertung der BMP Typ I Rezeptor abhängigen Differenzierung parental C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Markergen / Zelllinie	r-C3H10T $\frac{1}{2}$	r-BMPR-IA	r-BMPR-IA-DN	r-BMPR-IB	r-BMPR-IB-DN
Alkalische Phosphatase	-	↑	-	↑	↑
Cbfa-1	-	-	↓	-	-
Kollagen Typ I	-	-	-	-	-
Osteocalcin	-	↑	-	↑	↑
Osteonectin	-	-	↓	-	-
Osteopontin	-	-	↑	-	-
PTH/PTHrP-Rezeptor	-	↑	-	↑	↑
von Kossa	-	-	-	-	↑
Kollagen Typ II	-	↑	↓	↑	↑
Kollagen Typ IX	-	-	-	-	↑
FGF-Rezeptor 3	-	↑	-	↑	↑
Alcian	-	-	-	-	↑

- keine Regulation; ↓ Repression; ↑ Induktion

Neben der Induktion chondro-/osteogener Markergene führt die Expression funktioneller BMP Typ I Rezeptoren zu einer Zunahme der Teilungsaktivität; die Zellen zeigen eine heterogene, vielschichtige Morphologie. Histologisch können in beiden Kulturen nur Alkalische Phosphatase positive Zellen detektiert werden, die Ablagerung chondrogener Matrix oder distinkte Mineralisierungszonen können nicht beobachtet werden. Die Induktion der BMP Typ IA oder Typ IB Rezeptor transfizierten Zellen in die chondro/osteogene Entwicklungsrichtung scheint nicht auf einen direkten Effekt der Typ I Rezeptoren zu basieren, vielmehr sezernieren C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen inhärent die entsprechenden Liganden [Gazit, 1993]. So wird im gesamten Kulturzeitraum BMP-4 exprimiert, welches funktionell homolog zu BMP-2 von BMP-2/-4 Rezeptoren gebunden wird und so Effekte hervorruft, die durch BMP-2/-4

vermittelt werden [Wu, 1996]. Die rekombinante Expression von BMP Typ I Rezeptoren scheint ausreichend zu sein, C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zur chondro-/osteogenen Differenzierung zu determinieren; die Zellen werden durch rekombinante BMP Typ I Rezeptoren für endogene Differenzierungssignale sensibilisiert.

Demgegenüber zieht die rekombinante Expression von dominant-negativen BMP Typ IA Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen eine dramatische Veränderung der Morphologie nach sich. Der ursprünglich fibroblastoide Phänotyp der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen geht durch Expression dominant-negativer BMP Typ IA Rezeptoren vollständig verloren (Abbildung 2.4.27). Offensichtlich werden Signale, die zum Erhalt der fibroblastoiden Morphologie dienen, durch die Signalunterbrechung aufgrund der dominant-negativen Aktivität des Typ IA Rezeptors abgeschirmt oder können ihren Einfluß auf Erhalt und Ausprägung des fibroblastoiden Erscheinungsbildes nicht gelten machen. Weder histologisch noch durch Analyse der Markergenexpression unterstützt, kann eine Induktion in die chondro-/osteogene oder adipogene Differenzierungsrichtung festgestellt werden (Tabelle 3.2). Vielmehr werden hier offenbar zusätzlich zu den chondro-/osteogenen Markergenen bestimmte Gene reprimiert oder induziert, welche neben der Morphologie den stabilen fibroblastoiden Phänotyp der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen repräsentieren.

Hingegen weisen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen, welche rekombinant dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimieren, eine deutliche chondro-/osteogene und auch adipogene Differenzierung auf (Kapitel 2.4.6). Die chondro-/osteogene Differenzierung wird durch die Induktion von Osteocalcin, PTH/PTHrP-Rezeptor, FGF-Rezeptor-3, Kollagen Typ II und Typ IX dokumentiert (Tabelle 3.2). Desweiteren kann eine deutliche Induktion der adipogenen Markergene adipoQ und aP-2 festgestellt werden (Abbildung 2.4.32). Im Gegensatz zu der Expression funktioneller Typ I Rezeptoren zeigen dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierende C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen auch in histologischen Färbungen eine deutliche chondro-/osteogene Differenzierung. Hier kann die Induktion Alkalischer Phosphatase, die Bildung chondrogener Matrix durch Alcian Blau Färbung und distinkte Mineralisierungszonen durch die von Kossa Färbung aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.32).

Offenbar sind zum Erhalt des typischen fibroblastoiden Phänotyps von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nicht nur inhärente BMP Typ IA Rezeptor vermittelte Signale notwendig, vielmehr scheint hier ein Gleichgewicht der Typ IA und Typ IB Signale ausschlaggebend zu sein. Die Unterbrechung des BMP Typ IB Rezeptor Signalweges ist ausreichend, um eine vom BMP Typ IA Rezeptor abhängige Differenzierung zu initiieren. Dieses zeigt ebenfalls an, daß hinsichtlich der BMP Typ I Rezeptoren in der BMP Rezeptor abhängigen Signalweiterleitung die BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren in homooligomeren Rezeptorkomplexen vorliegen. Lagen BMP Typ I Rezeptoren in heteromeren Komplexen vor, so würden die durch dominant-negative BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren vermittelten Effekte durch inhärente funktionelle BMP Typ IB respektive Typ IA Rezeptoren kompensiert werden. So konnte mittels TGF- $\beta$  Typ I Rezeptoren, welche Mutationen in der Aktivierungs- oder Kinasedomäne aufwiesen und sich funktionell komplementierten, gezeigt werden, daß mindestens zwei gleichartige Typ I Rezeptoren zur Ausbildung eines aktivierten Rezeptorkomplexes nötig sind, um eine Liganden-abhängige Transduktion des Signals zu ermöglichen [Weis-Garcia, 1996].

Der Verlust des fibroblastoiden Phänotyps durch Blockierung des BMP Typ IA Rezeptor- und die Initiation der Differenzierung durch Unterbrechung des BMP Typ IB Rezeptor-Signalweges zeigt an, daß C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in ihrer Differenzierungskapazität im Hinblick auf BMP Typ I Rezeptoren relativ fixiert oder determiniert sind. Der BMP Typ IA Rezeptor Signalweg ist der prädominante zum Erhalt des ursprünglichen Phänotyps und zum Initiieren des jeweiligen Entwicklungspotentials.

Neben einer möglichen Bevorzugung bestimmter Signalwege abhängig vom jeweiligen Differenzierungsstadium und Zellstatus sind die Spezifität der Liganden-Rezeptor-Bindung, die Ausbildung von Rezeptorkomplexen bestimmter Zusammensetzung und zytosolische Mediatoren für die Weiterleitung BMP2-abhängiger Signale zur Initiation der Differenzierung von Bedeutung.

Der marginale Einfluß von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren auf die BMP-2 vermittelte Differenzierung könnte auf eine nicht ausreichende Dichte an dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren in Rezeptorkomplexen zurückzuführen sein. Demzufolge ist eine ausreichende Expressionsrate an dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren notwendig, um in Konkurrenz mit endogen exprimierten funktionellen Rezeptoren eine Signalunterbrechung zu bewirken. Da in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen BMP Typ IA Rezeptoren inhärent weitaus stärker exprimiert werden und durch Expression dominant-negativer Typ IA Rezeptoren dominant-negative Effekte hervorgerufen werden können, sollte die nachgewiesene Expression an dominant-negativen Typ IB Rezeptoren ausreichend sein (Abbildung 2.2.3/2.4.20), um die Signalweiterleitung zu unterbinden. Dieses wird zudem durch die beobachteten Effekte von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen nahe gelegt.

Neben einer hinreichenden Expressionshöhe an entsprechenden Rezeptoren spielen die Bindungsspezifitäten und -affinitäten zur Ausbildung aktiver BMP Rezeptorkomplexe eine wichtige Rolle. BMP-2 bindet diverse Typ II und Typ I Rezeptoren aus der TGF- $\beta$  Rezeptorfamilie, so konnte die Bindung an Activin Typ II Rezeptoren (ActR-II/ActR-IIB), an den BMP Typ II Rezeptor (BMPR-II), an Activin Typ I Rezeptoren (ActR-I) und an BMP Typ I Rezeptoren (BMPR-IA/BMPR-IB) gezeigt werden (Abbildung 3.1) [Yamashita, 1996].

Hinsichtlich der Bindungsaffinitäten können allerdings Unterschiede ausgemacht werden. So weist BMP-2 eine höhere Affinität zum BMP Typ II Rezeptor auf, wenn dieser in Kombination mit ActR-I oder BMPR-IB exprimiert wird. Die Koexpression von BMPR-II und BMPR-IA in COS-1 Zellen führt zu einer BMP-2 abhängigen Komplexbildung von geringerer Affinität [Liu, 1995]. Für BMP-4 konnte ebenfalls gezeigt werden, daß im Gegensatz zu BMP Typ IA Rezeptoren BMP Typ IB und Typ II Rezeptoren selbst bei geringer Ligandenkonzentration in der Lage sind funktionelle Rezeptorkomplexe auszubilden [Nohno, 1995]. Inwieweit diese BMP2-abhängigen Rezeptoraffinitäten im Kontext der in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen exprimierten Rezeptoren (Abbildung 2.4.1) Gültigkeit besitzen, ist allerdings noch ungeklärt, zumal die Bindungsspezifität des Typ I Rezeptors anscheinend vom Typ II Rezeptor, mit dem er koexprimiert wird, abhängt [Derynck, 1997].

Auch könnte die geringere Affinität von BMP Typ IA Rezeptoren zur Komplexbildung mit BMP-2 und BMP Typ II Rezeptoren auf eine hochaffine Komplexbildung von BMP Typ IA Rezeptoren mit anderen Typ II Rezeptoren hindeuten. Als potentielle Typ II Rezeptoren könnten hier Activin Typ II und Typ IIB Rezeptoren oder auch bisher unbekannte BMP Typ II Rezeptoren dienen. Die Ausbildung funktioneller BMP Typ IA Rezeptorkomplexe mit Activin Typ II Rezeptoren konnte für einige Zelltypen gezeigt werden [Yamashita, 1995; Hoodless, 1996]. Auch die BMP2-abhängige osteogene Differenzierung von C2C12-Zellen konnte der Ausbildung von Rezeptorkomplexen mit BMP Typ IA Rezeptoren, BMP Typ II Rezeptoren oder Activin Typ II Rezeptoren zugeordnet werden [Chaloux, 1998].

Die hohe Expression von BMP Typ IB Rezeptoren auf mRNA Ebene, der immunologische Nachweis der rekombinanten Expression von dominant-negativen BMP Typ IB Rezeptoren über fusionierte Flag-Epitope, die Affinität von BMP-2 gegenüber BMP Typ IB Rezeptoren und die Effekte von dominant-negativen Typ IB Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen zeigen an, daß funktionelle Rezeptorkomplexe mit BMP-2 als Liganden in dominant-negative BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen ausgebildet werden. Dennoch kann eine signifikante Modulation der BMP-2 vermittelten Differenzierung in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hier

nicht beobachtet werden. Demnach wird die BMP2-abhängige chondro-/osteogene Differenzierung in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen primär durch den BMP Typ IA Rezeptor vermittelt.

Regulatorische Mediatoren der Smad-Familie (Smad-1, Smad-5 und Smad-8) werden durch funktionelle BMP Rezeptorkomplexe aktiviert. In verschiedenen Systemen konnte gezeigt werden, daß Smad-1 und Smad-5 ausreichend sind, um die BMP-abhängige osteogene Differenzierung zu initiieren oder auch die BMP vermittelte Signalweiterleitung zu beeinflussen [Liu, 1996; Hoodless, 1996; Yamamoto, 1997; Nishimura, 1998]. Die osteogene Entwicklung scheint demnach über den Smad-Signalweg vermittelt zu werden, während für die chondro-gene Differenzierung sowohl Smad-abhängige als auch Smad-unabhängige Signalwege postuliert werden [Ju, 1999; Fujii, 1999]. In C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen konnte die Expression verschiedener Mitglieder der Smad-Familie gezeigt werden (Abbildung 2.4.1), so daß in diesen Zellen eine BMP Typ I Rezeptor-abhängige Aktivierung gegeben ist. Inwieweit in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ein aktiver, Smad-abhängiger oder -unabhängiger BMP Typ IB Rezeptor Signalweg existiert, konnte hier durch konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren gezeigt werden.

Ein einzelner Aminosäureaustausch von Glutamin zu Asparaginsäure (Q-D) an Position 203 innerhalb der GS-Aktivierungsdomäne des parentalen BMP Typ IB Rezeptors führt zur permanenten Aktivierung der intrazellulären Serin-/Threonin-Kinase des Typ IB Rezeptors [Wieser, 1995; Zou, 1997]. Diese konstitutiv-aktiven Rezeptoren sind in der Lage, Liganden-unabhängig BMP Typ IB Rezeptor-vermittelte Signale stetig in die Zelle weiterzugeben (Kapitel 2.1.4). Die Expression der konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren führt hier prädominant zur osteogenen Differenzierung, während das chondrogene Differenzierungspotential eher als marginal zu bezeichnen ist (Kapitel 2.4.8; Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3:** Regulation chondro-/osteogener Markergene und histologische Bewertung der BMP Typ IB Rezeptor abhängigen Differenzierung

Markergen / Zelllinie	r-C3H10T $\frac{1}{2}$	r-BMP-2	r-BMPR-IB-CA
Alkalische Phosphatase	-	↑	↑↑
Cbfa-1	-	↑	-
Kollagen Typ I	-	-	-
Osteocalcin	-	↑	↑
Osteonectin	-	-	-
Osteopontin	-	↑	-
PTH/PTHrP-Rezeptor	-	↑	↑
von Kossa	-	↑	↑↑
Kollagen Typ II	-	↑	-
Kollagen Typ IX	-	↑	-
FGF-Rezeptor 3	-	↑	-
Alcian	-	↑	-

- keine Regulation; ↑/↑↑ Induktion

Das beträchtliche osteogene Potential konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren exprimierender C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen spiegelt sich besonders in der Induktion Alkalischer Phosphatase und den ausgeprägten Kalziumablagerungen in distinkten Mineralisierungszonen wider (Abbildung 2.4.42). Auf der Ebene der Genexpression kann weiterhin die Induktion von Osteocalcin, PTH/PTHrP-Rezeptor und Osteopontin als spezifische osteogene Markergene festgestellt werden, welches die Differenzierung in die osteogene Entwicklungsrichtung dokumentiert (Abbildung 2.4.39).



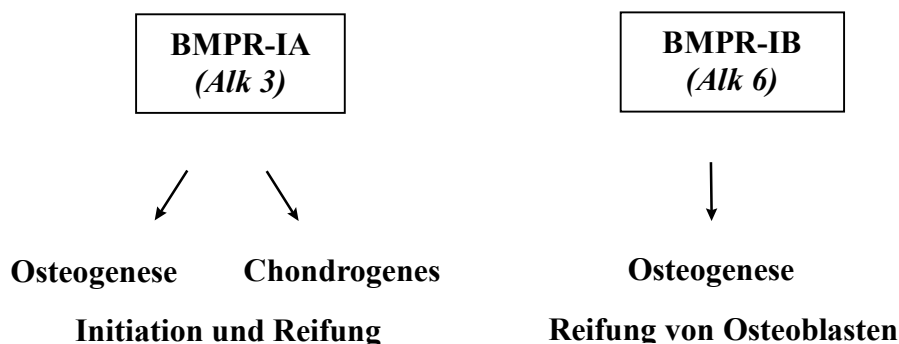
Demgegenüber kann histologisch nur vereinzelt die Ausbildung chondrogener Matrix aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.42). Auch die chondrogenen Markergene FGF-Rezeptor 3, Kollagen Typ II und Typ IX werden nicht oder im Fall von Kollagen Typ II nur sehr schwach induziert (Abbildung 2.4.40).

Neben der osteogenen Differenzierung kann ebenfalls anhand der Morphologie und der Induktion der adipogenen Markergene aP-2 und adipoQ eine Differenzierung in die adipogene Entwicklungsrichtung aufgezeigt werden (Abbildung 2.4.41/2.4.42).

Die prädominante osteogene Differenzierung von konstitutiv-aktiven BMP Typ IB Rezeptoren und die Blockierung der BMP2-abhängigen Verknöcherung *in vivo* durch dominant-negative Typ IB Rezeptoren zeigt auf, daß C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen einen aktiven BMP Typ IB Rezeptor-vermittelten Signalweg aufweisen. Zudem kann hierdurch die Beteiligung von BMP Typ IB Rezeptoren an der Reifung von Osteoblasten dargelegt werden, welches durch Null-Mutationen des BMP Typ IB Rezeptors in der Maus ebenfalls bestätigt wird [Yi, 2000].

Dem BMP Typ IA Rezeptor kommt während der BMP2-abhängigen Differenzierung eher eine Rolle während der Initiations- und Reifungsphase der chondro-/osteogenen Entwicklung zu. Das BMP-2 Signal wird in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hauptsächlich durch den BMP Typ IA Rezeptor in die Zelle weitergeleitet (Abbildung 3.2).

Hinsichtlich des adipogenen Differenzierungspotentials kann aus den gewonnenen Daten kein eindeutiges Bild hinsichtlich einer präferentiellen Rezeptorbeteiligung abgeleitet werden. Hier mag die Ausprägung des BMP-2 Signals einen Einfluß auf die adipogene Differenzierung zeigen, wobei geringe Dosen von BMP-2 eine adipogene Entwicklung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen favorisieren [Wang, 1993]. Die Koexpression von funktionellen oder dominant-negativen BMP Typ I Rezeptoren ist kompetitiv zu inhärent exprimierten Rezeptoren, so daß ein vollständiges Unterbinden oder Fördern eines Signalweges kaum möglich ist. Ein geringer Anteil des rekombinant exprimierten BMP-2 mag so in jedem Fall zu einer Initiation der Adipogenese führen. Expression konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren zeigt die Beteiligung dieses Rezeptors an der adipogenen Differenzierung an, wobei aber eine wichtige Rolle von Typ IA Rezeptoren in diesem Prozeß nicht ausgeschlossen werden kann.



**Abbildung 3.2:** Rolle der BMP Typ I Rezeptoren (BMPR-IA und BMPR-IB) in der BMP2-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$

### 3.3 Growth and Differentiation Factor-5 abhängige Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T½

Während der Suche nach weiteren Mitgliedern der TGF- $\beta$  Superfamilie konnten neue Gene identifiziert werden, die als *Growth and Differentiation Factors* (GDFs) bezeichnet wurden [Lee, 1990; McPherron, 1993]. GDF-5 als BMP verwandter Wachstums- und Differenzierungsfaktor induziert in klonalen Zelllinien und Primärkulturen die Initiation der chondro-/osteogenen Differenzierung und induziert *in vivo* ektopisch Knochen und Knorpel oder Sehnen und Ligamente [Chang, 1994; Höttner, 1996; Wolfman, 1997; Erlacher, 1998]. Die rekombinante Expression von GDF-5 in transgenen Mäusen läßt auf eine Beteiligung von GDF-5 an der Rekrutierung mesenchymaler Zellen und an der Reifung von Chondrozyten schließen [Tsumaki, 1999]. Mutationen im GDF-5 Gen der Maus (*brachyodism*) zeigen eine Beteiligung von GDF-5 an der normalen Skelettknochenentwicklung an [Storm, 1994].

Zum Verifizieren der GDF5-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung in C3H10T½-Zellen konnte die cDNA des humanen GDF-5 aus primärem Knorpelgewebe isoliert und in ein geeignetes Vektorsystem zur rekombinanten Expression in C3H10T½-Zellen kloniert werden (Kapitel 2.1.5/2.2.3). Die Expression von rekombinantem humanem GDF-5 in C3H10T½-Zellen führt zu einer schwachen Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung, welche durch die Koexpression von funktionellen BMP Typ IA oder Typ IB Rezeptoren gesteigert werden kann (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.3:** Regulation chondro-/osteogener Markergene und histologische Bewertung der GDF5-abhängigen Differenzierung

Markergen / Zelllinie	r-C3H10T½	r-GDF-5	r-GDF-5 r-BMPR-IA	r-GDF-5 r-BMPR-IB
Alkalische Phosphatase	-	↑	↑↑	↑↑
Cbfa-1	-	-	-	-
Kollagen Typ I	-	-	-	-
Osteocalcin	-	↑	↑↑	↑↑
Osteonectin	-	-	-	-
Osteopontin	-	-	↑	↑
PTH/PTHrP-Rezeptor	-	↑	↑	↑
von Kossa	-	-	-	-
Kollagen Typ II	-	↑	↑↑	↑
Kollagen Typ IX	-	-	↑	↑
FGF-Rezeptor 3	-	↑	↑	↑
Alcian	-	-	↑	-

- keine Regulation; ↑/↑↑ Induktion

GDF-5 exprimierende C3H10T½-Zellen weisen ein schwaches chondro-/osteogenes Differenzierungspotential auf, welches durch die Induktion spezifischer osteogener und chondrogener Markergene wie Osteocalcin, PTH/PTHrP-Rezeptor, Kollagen Typ II und FGF-Rezeptor 3 gezeigt werden kann (Abbildung 2.4.34/2.4.35). Desweiteren ist eine schwache Induktion von Alkalischer Phosphatase zu beobachten, während histologisch die Ausbildung von distinkten Mineralisierungszonen oder die Ablagerung chondrogener Matrix nicht gezeigt werden kann (Abbildung 2.4.37/2.4.38). Im Vergleich mit dem BMP2-abhängigen chondro-/osteogenen Potential von C3H10T½-Zellen ist hier die Induktion der Differenzierung durch GDF-5 als marginal zu bezeichnen. Auch die Stimulation der osteogenen Entwicklung mittels aufgereinigtem GDF5-Protein in C3H10T½-, MC3T3-E1- und C2C12-Zellen ist im Gegensatz zu

BMP-2 eher minimal, welches sich auch in der ektopischen Knochenbildung durch GDF-5 und BMP-2 widerspiegelt. Während das Potential von BMP-2 zur ektopischen Knochenbildung in mehreren Laboratorien gezeigt werden konnte, ist unter vergleichbaren Bedingungen für GDF-5 sowohl eine Knochen induzierende als auch nicht-induzierende Wirkung beschrieben [Hötten, 1996; Wolfman, 1997]. Auch das temporäre und spatiale Expressionsmuster von GDF-5 respektive BMP-2 während der embryonalen Extremitätenentwicklung, wo GDF-5 in knorpeligen Zentren des sich entwickelnden Röhrenknochens exprimiert wird, mag eher auf ein chondrogenes denn auf ein osteogenes Potential von GDF-5 hindeuten [Lyons, 1990; Chang, 1994]. Überexpression von GDF-5 während der Gelenkentwicklung im Hühnchen-Modell führt analog zum GDF-5 Expressionsmuster zu einer Verlängerung knöcherner Elemente, welche auf eine Zunahme an Chondrozyten zurückgeführt wird [Francis-West, 1999].

Das schwache Differenzierungspotential von GDF-5 exprimierenden im Vergleich zu BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kann auf die Bevorzugung unterschiedlicher Rezeptorkomplexe oder auch auf differierende Rezeptoraffinitäten zurückzuführen sein. Obwohl für GDF-5 die Bindung respektive die Ausbildung aktiver Rezeptorkomplexe ähnlich wie bei BMP-2 für Activin Typ II und Typ I Rezeptoren und für BMP Typ II und Typ I Rezeptoren gezeigt werden konnte (Abbildung 3.1), zeigt GDF-5 eine erhöhte Affinität und Funktionalität bei Koexpression mit BMP Typ IB Rezeptoren [Yamashita, 1996; Erlacher, 1998]. Desweiteren konnte in ROB-C26-, U-1240- und Mv1Lu-Zellen gezeigt werden, daß GDF-5 BMP Typ II und Typ IB Rezeptoren bindet, wobei aber eine Bindung an BMP Typ IA Rezeptoren nicht nachgewiesen werden konnte [Nishito, 1996]. Die schwache Induktion der GDF5-abhängigen Differenzierung in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen mag somit auf die äußerst niedrige Expressionsrate an inhärentem BMP Typ IB Rezeptor zurückzuführen sein (Abbildung 2.4.1).

Die Koexpression von GDF-5 und funktionellen BMP Typ I Rezeptoren in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt für Typ IA und Typ IB Rezeptoren zu einer signifikanten Steigerung des GDF-5 abhängigen chondro-/osteogenen Potentials, welche allerdings hier nicht zu einer chondro-/osteogenen Differenzierung äquivalent zu BMP-2 exprimierenden Zellen führt (Tabelle 3.2; Kapitel 2.4.7). Die Expression von funktionellen BMP Typ IA Rezeptoren in GDF-5 exprimierenden Zellen führt im Gegensatz zu GDF-5 und BMP Typ IB Rezeptoren exprimierenden Zellen zu einer verstärkten chondrogenen Differenzierung, welches histologisch durch die Anfärbung chondrogener Matrix und die erhöhte Expression an Kollagen Typ II dokumentiert wird (Abbildung 2.4.35/2.4.37).

Die höherer Affinität von GDF-5 zu BMP Typ IB denn zu BMP Typ IA Rezeptoren deutet darauf hin, daß hier in der GDF5- und BMP Typ IA Rezeptor-vermittelten Differenzierung ein synergistischer Effekt vorliegt. Das hier zu beobachtende Differenzierungspotential ist mit dem Potential funktioneller BMP Typ IA Rezeptoren in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen durchaus zu vergleichen (Kapitel 2.4.5), so daß hier sowohl BMP Typ IA Rezeptor- als auch GDF5-vermittelte Signale losgelöst voneinander zu einer chondro-/osteogenen Differenzierung beitragen könnten. Ähnlich den Expressionsstudien funktioneller BMP Typ IB Rezeptoren in der BMP2-abhängigen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kann auch hier eine deutlich gesteigerte Induktion der GDF5-vermittelten Signale durch Koexpression von BMP Typ IB Rezeptoren nicht dokumentiert werden, obgleich anhand konstitutiv-aktiver Rezeptoren ein aktiver BMP Typ IB Rezeptor-vermittelter Signalweg aufgezeigt werden konnte.

Ebenso wie für die BMP2-abhängige Signaltransduktion geltend, könnten auch hier in der GDF5-abhängigen BMP Typ IB Rezeptor-vermittelten Signalweiterleitung nicht nur Ligan-den-Rezeptor-Affinitäten und die Ausbildung funktioneller Rezeptorkomplexe sondern auch

das Vorhandensein von Proteinen zur Rekrutierung von zytosolischen Signalmolekülen zur BMP Typ IB Rezeptor-abhängigen Signalweiterleitung eine entscheidende Rolle spielen. Die wichtige Bedeutung dieser Moleküle zur Rekrutierung von Smads konnte für die TGF- $\beta$ -abhängige Signaltransduktion mit SARA (Kapitel 1.3.2) gezeigt werden [Tsukazaki, 1998]. Ob diese Moleküle in der BMP Rezeptor-abhängigen Signalweiterleitung involviert sind und in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen exprimiert werden, ist allerdings noch ungeklärt.

Letztendlich sind Knorpel- und Knochenstrukturen von der spatialen, temporären oder auch sequentiellen Expression verschiedener BMPs und ihrer korrespondierenden Rezeptoren abhängig, wobei C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen ein Stadium dieser Entwicklung repräsentieren [Lyons, 1989b; Horton, 1993]. Somit zeigen auch verschiedene Mitglieder der BMP- oder TGF- $\beta$  Superfamilie ein unterschiedliches Potential hinsichtlich einer Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung, welches für ausgewählte BMPs in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen gezeigt werden konnte [Ahrens, 1993; Bächner, 1998].

Die Expression von GDF-5 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt hier zu einer schwachen Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung. Das geringe Entwicklungspotential von GDF-5 und BMP Typ IB Rezeptor exprimierenden Zellen zeigt wiederum an, daß C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in ihrem Potential prädominant auf den BMP Typ IA Rezeptor-vermittelten Signalweg festgelegt sein könnten.

### 3.4 Die Rolle von Pex in der osteogene Differenzierung mesenchymaler Zellen

Pex (*phosphate-regulating gene with homologies to endopeptidases on the X chromosome*) als ein integrales Membranprotein mit strukturellen Homologien zu neutralen Endopeptidasen wird in fötalen und adulten Kalvarien und Röhrenknochen des Menschen und der Maus exprimiert [Beck, 1997]. Interessanterweise kann weiterhin die Expression von Pex in Lunge, Ovarien, Leber und Muskel, nicht aber in der Niere als Zielorgan des Parathyroidhormons gezeigt werden [Du, 1996; Grieff, 1997]. *In situ* Hybridisierungen im sich entwickelnden Mausembryo legen eher eine Beteiligung an der Osteo- und Odontogenese nahe. Hier kann die Pex-mRNA in Osteoblasten der vertebrealen endochondralen Ossifikationszentren, nicht aber in angrenzenden Kalzifizierungs- oder Knorpelstrukturen detektiert werden [Ruchon, 1998].

Desweiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe mittels subtraktiver Klonierung Pex als Östrogen-reguliertes Gen aus primären Knochenmarkstromazellen der Ratte identifiziert werden [Lauber, 1998]. Im hier verwendeten zellulären chondro-/osteogenen Differenzierungsmodell der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kann in diesen mesenchymalen Vorläuferzellen eine ausgeprägte Expression von Pex gezeigt werden, welche durch die rekombinante Expression von BMP-2 und BMP Rezeptor-abhängig reguliert wird (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4:** BMP- und BMP Rezeptor-abhängige Regulation von Pex in mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Zelllinie / Markergen	Pex
r-C3H10T $\frac{1}{2}$	-
r-BMPR-IA	-
r-BMPR-IA-DN	-
r-BMPR-IB	↑
r-BMPR-IB-DN	↓
r-BMP-2	↓↓
r-BMP-2 / r-BMPR-IA	↓↓↓
r-BMP-2 / r-BMPR-IA-DN	-
r-BMP-2 / r-BMPR-IB	-
r-BMP-2 / r-BMPR-IB-DN	↓↓
r-GDF-5	-
r-GDF-5 / r-BMPR-IA	↓↓
r-GDF-5 / r-BMPR-IB	↓
r-BMPR-IB-CA	-

- keine Regulation; ↑ Induktion; ↓↓↓↓↓↓ Repression

Die Expression von Pex wird in schwach differenzierenden, rekombinanten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen kaum reprimiert; dieses gilt für parentale C3H10T $\frac{1}{2}$ , funktionelle oder dominant-negative BMP Typ I Rezeptoren und GDF-5 exprimierende Zellen (Abbildung 2.4.4/2.4.26/2.4.32 und 2.4.36). Zeigen die rekombinanten C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen hingegen eine ausgeprägte Tendenz zur chondro-/osteogenen Differenzierung, so kann in Kulturen, die eher zur chondrogenen Entwicklung tendieren, eine verstärkte Repression der Pex-Expression detektiert werden. Demgegenüber weisen Kulturen, die der osteogenen Differenzierungsrichtung zuzuordnen sind, keine oder nur eine marginale Repression von Pex auf; dieses gilt besonders für konstitutiv-aktive BMP Typ IB Rezeptoren und für BMP-2 und funktionelle BMP Typ IB Rezeptoren exprimierende Zellen (Abbildung 2.4.9/2.4.41).

Deletionen im Pex-Gen führen im Menschen und in der Maus zu Wachstumsstörungen, Knochen deformationen und Rachitis [HYP Consortium, 1995; Strom, 1997]. Diese Störungen der Knochenentwicklung könnten auf die Wirkungsweise von Pex als Parathyroidhormon (PTH) spaltende Endopeptidase zurückzuführen sein [Lipman, 1998], so daß eine gerichtete Überexpression von Pex zu einer verstärkten Differenzierung der Chondrozyten zu terminal differenzierten, hypertrophen Chondrozyten und somit zu einer gesteigerten Ossifikation beitragen könnte. So zeigt die gezielte Expression von *PTH-related Peptide* (PTHrP) in Chondrozyten mittels des Kollagen Typ II Promotors die kritische Aufgabe von PTHrP als ein Inhibitor der Differenzierung von Chondrozyten an. Hier kann eine verzögerte endochondrale Ossifikation beobachtet werden, die bei Mäusen zu Nachkommen führt, die mit einem knorpeligen endochondralen Skelett geboren werden [Weir, 1996]. Eine ähnliche Inhibition der chondrogenen Differenzierung kann bei transgenen Mäusen beobachtet werden, die einen konstitutiv-aktiven PTH/PTHrP-Rezeptor aufweisen [Schipani, 1995/1997]. Diese Verzögerung des Verknöcherungsprozesses scheint auf eine Inhibition der terminalen Differenzierung von Chondrozyten zu hypertrophen respektive apoptotischen Chondrozyten vor der Ossifikation zurückzuführen sein [Henderson, 1995]. Pex als PTH-spaltende Endopeptidase mag hier an der Regulation des chondro-/osteogenen Übergangs beteiligt sein.

Weiterhin kann im sich entwickelnden Mausembryo eine temporäre und spatiale Korrelation der Expression von Pex mit der beginnenden Matrixablagerung während der Verknöcherung aufgezeigt werden [Ruchon, 1998]. Pex könnte somit eine Rolle in der Matrixreifung oder Mineralisierung des sich entwickelnden Knochens spielen. So kann ebenfalls im Mausmodell der Hyp- und Gy-Mäuse, die große Deletionen im Pex-Gen aufweisen, eine anomale Bildung des Knochens und der Zähne beobachtet werden [Beck, 1997; Strom, 1997]. In Hyp-Mäusen ist hier eine verzögerte Mineralisierung der extrazellulären Knochenmatrix festzustellen, die auf den Verlust der Pex-Funktion zurückzuführen ist [Ecarot, 1992]. Auch Osteoblastenkulturen der Hyp-Maus weisen eine verringerte Kalziumeinlagerung in der extrazellulären Matrix und eine Reduktion an Mineralisierungszonen auf [Xiao, 1998].

Obgleich die Aufklärung der Funktion von Pex in der endochondralen Knochenbildung letztendlich weiter zu verifizieren ist, zeigt hier die Repression von Pex im zellulären Modell der mesenchymalen Entwicklung der C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen die Differenzierung entlang der chondrogenen Entwicklungslinie an, während hier in osteogen differenzierenden Zellen eine Induktion oder auch permanente Expression von Pex beobachtet wird. Pex könnte somit als ein neues und wichtiges Markergen der chondro-/osteogenen Differenzierung mesenchymaler Gewebe angenommen werden.

### 3.5 Modell der BMP2-vermittelten chondro-/osteogenen Differenzierung in mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$

In Abbildung 3.4 ist basierend auf unseren Ergebnissen ein Arbeitsmodell zur BMP2-abhängigen chondro-/osteogenen Differenzierung im zellulären Modell der mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$  dargestellt.

Die Expression von BMP-2 in diesem System führt zur Ausbildung distinkter mesenchymaler Zellpopulationen wie Osteoblasten und Chondrozyten. Die Vermittlung der BMP-abhängigen Differenzierung erfolgt durch BMP-Rezeptorkomplexe mit den BMP Typ I Rezeptoren BMPR-IA (*Alk-3*) und BMPR-IB (*Alk-6*). Hierbei ist das BMP-2 Signal zur Initiation der Chondro- und Osteogenese prädominant von BMP Typ IA Rezeptoren abhängig, während die BMP Typ IB Rezeptoren eher eine Rolle in der osteogenen Reifung zu spielen scheinen. Die osteogene Initiation wird in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen durch den zytosolischen Mediator Smad-1 vermittelt. Die Aktivierung weiterer Smad-Proteine (Smad-5/Smad-8) oder des MAPK-Signalwegs mag hier in Abhängigkeit vom PTH/PTHrP-Rezeptor und dem FGF-Rezeptor 3 zur Induktion der chondrogenen Entwicklung führen [Ju, 1999; Dissertation, S. Czichos].

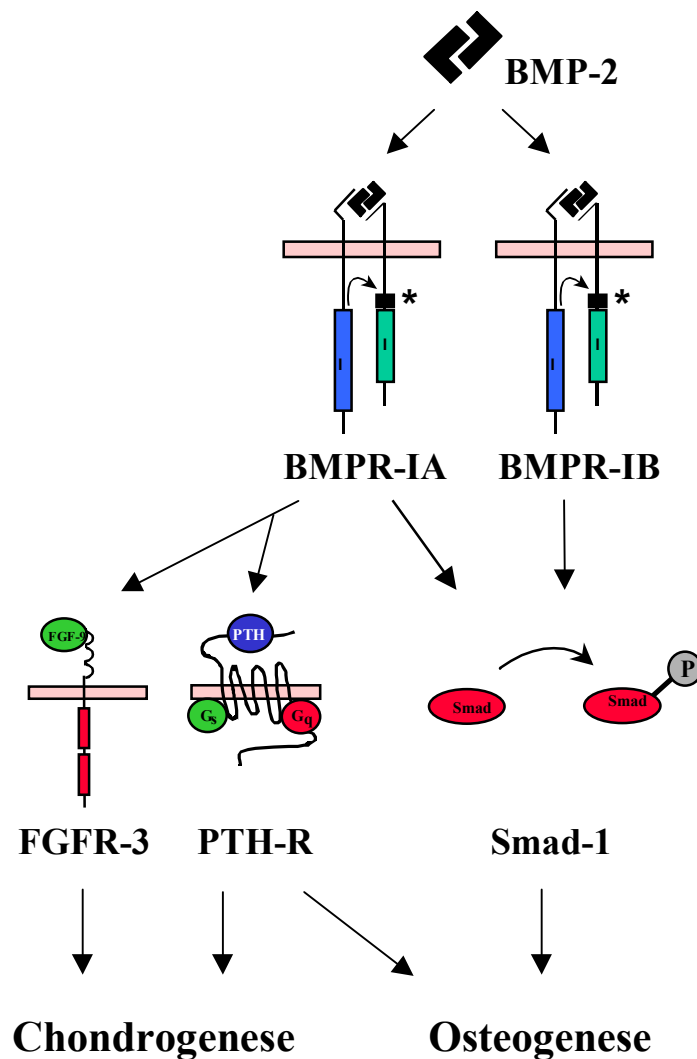


Abbildung 3.4: Modell der BMP2-abhängigen Signalkaskade zur chondro-/osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

## 4 Zusammenfassung

Die *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) Superfamilie stellt eine große Familie konservierter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren dar, die als sezernierte Faktoren einen großen Einfluß auf unterschiedlichste Zelltypen aufweisen. Neben der Regulation von Wachstum, Differenzierung, Matrixsynthese und Apoptose zeigen viele der Mitglieder wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung, wie Musterbildung und Spezifikation von Geweben.

Hier konnte eine wichtige Rolle in frühen Induktions- und Differenzierungsprozessen mesenchymaler Gewebe wie Knochen und Knorpel den *Bone Morphogenetic Proteins* (BMPs) zugeordnet werden, wobei BMP-2 als prominentes Mitglied dieser Familie osteoinduktive Eigenschaften *in vivo* und auf prädeterminierte osteogene und nicht-osteogene Zelllinien zeigt. In den letzten Jahren konnten Komponenten der BMP2-vermittelten Signalkaskade auf Ebene der Zelloberflächenrezeptoren und der zytosolischen Signalmoleküle identifiziert und charakterisiert werden. Die molekularen Mechanismen und das Zusammenspiel BMP-abhängiger Signalmoleküle, die der chondro-/osteogenen Entwicklung zugrunde liegen, sind allerdings noch weitgehend ungeklärt.

Zum Verifizieren dieser BMP-abhängigen Entwicklung im Mausmodell findet hier die pluripotente mesenchymale Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  Verwendung. Die rekombinante Expression von humanem BMP-2 in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen führt zur Ausprägung distinkter mesenchymaler Zellpopulationen, wie Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten. Das Ziel dieser Studie war, die Rolle der Bone Morphogenetic Protein Typ I Rezeptoren (BMP Typ IA und BMP Typ IB Rezeptoren) in der BMP2-abhängigen Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen entlang der chondro-/osteogenen Entwicklungslinie zu charakterisieren. Hierzu wurden eukaryotische Expressionsvektoren, die eine konstitutive Expression von parentalen (Wildtyp), dominant-negativen oder konstitutiv-aktiven BMP Typ IA respektive BMP Typ IB Rezeptoren erlauben, stabil in das Genom von parentalen oder BMP-2 exprimierenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen transfiziert. Der Einfluß der BMP Typ I Rezeptorvarianten auf das chondro-/osteogene Differenzierungspotential wurde anhand von histologischen Färbungen und der Analyse von Genexpressionsmustern spezifischer chondro-/osteogener Markergene mittels semi-quantitativer RT-PCR dokumentiert.

Die BMP2-abhängige Initiation der chondrogenen und osteogenen Differenzierung von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vitro* wird durch dominant-negative BMP Typ IA Rezeptoren inhibiert, während diese durch die Koexpression dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren nicht beeinflußt wird. Demgegenüber kann die BMP2-vermittelte Differenzierung durch Koexpression funktioneller BMP Typ IA Rezeptoren gefördert werden, wobei den histologischen Färbungen vor allem eine Promotion der chondrogenen Entwicklungslinie abgeleitet werden kann. Auch die Koexpression funktioneller BMP Typ IB Rezeptoren führt zu einer verstärkten BMP2-abhängigen Differenzierung in diesem zellulären Differenzierungssystem, die allerdings im Vergleich zu BMP Typ IA Rezeptoren eine schwächere ist. Diese „gain of function“ und „loss of function“-Studien zeigen an, daß die BMP2-abhängigen Signale zur chondrogenen und osteogenen Differenzierung in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen prädominant durch den BMP Typ IA und nicht durch den BMP Typ IB Rezeptor vermittelt werden.

Diese Befunde werden durch Expression der entsprechenden Rezeptorvarianten in parentalen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen bestätigt. Hier führt das selektive Ausschalten des BMP Typ IA Rezeptors zu einer drastischen Modulation des fibroblastoiden Phänotyps; C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen sind in der



Kapazität zum Erhalt ihres typischen Charakters und zur Initiation der Differenzierung auf den BMP Typ IA Rezeptor Signalweg fixiert. So führt auch die Expression dominant-negativer BMP Typ IB Rezeptoren zu einer schwachen Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung. Die marginale Expression endogener BMP Typ IB Rezeptoren ist zum Erhalt des typischen fibroblastoiden Erscheinungsbildes notwendig; das selektive Ausschalten dieses Signalweges und somit die Promotion der inhärenten BMP Typ IA Rezeptor-vermittelten Signale führt bereits zur Induktion der chondro-/osteogenen Differenzierung. Analog hierzu ist die Expression funktioneller BMP Typ IA Rezeptoren ausreichend, um die chondro-/osteogene Entwicklung aufgrund der inhärenten Expression von BMP-4 als Liganden zu initiieren. Diese Bevorzugung des BMP Typ IA Rezeptor-vermittelten Signalweges und die geringe Ausprägung des BMP Typ IB Rezeptorsignalweges in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen spiegelt sich ebenfalls in dem schwächeren Differenzierungspotential funktioneller BMP Typ IB Rezeptor oder GDF-5 exprimierender Zellen wider.

Die Expression konstitutiv-aktiver BMP Typ IB Rezeptoren zeigt an, daß C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen sehr wohl einen aktiven BMP Typ IB Rezeptor-vermittelten Signalweg aufweisen, der zudem eher für die osteogene Entwicklung verantwortlich zu sein scheint.

Auch die Transplantationsexperimente rekombinanter C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen *in vivo* zeigen an, daß in der BMP2-abhängigen Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzelllinie C3H10T $\frac{1}{2}$  der BMP Typ IA Rezeptor für Initiation und Reifung chondro-/osteogener Zellen verantwortlich ist, während der Einfluß des BMP Typ IB Rezeptors eher marginal und der osteogenen Differenzierung zur Reifung von Osteoblasten zuzuordnen ist. Hier kann *in vivo* analog zu den Studien *in vitro* für BMP-2 und dominant-negative BMP Typ IA Rezeptor koexprimierende Zellen keine Differenzierung entlang der chondro-/osteogenen Entwicklungsrichtung beobachtet werden. Demgegenüber kann durch das selektive Ausschalten des BMP Typ IB Rezeptors *in vivo* eine Inhibition der Osteogenese aufgezeigt werden, während die Initiation der Chondrogenese hier nicht beeinträchtigt wird.

Diese Befunde zur Rolle von BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren tragen zum Verständnis der BMP2-abhängigen Prozesse und Signalmechanismen in der chondro-/osteogenen Entwicklung mesenchymaler Vorläuferzellen zu Knochen und Knorpel bei. Erstmals konnte hier im zellulären Differenzierungssystem der mesenchymalen Vorläuferzellen C3H10T $\frac{1}{2}$  die direkte Abhängigkeit der BMP2-vermittelten chondro-/osteogenen Differenzierung von BMP Typ IA und Typ IB Rezeptoren aufgezeigt werden. Diese Studien tragen einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der BMP-abhängigen Signale während der Embryonalentwicklung mesenchymaler Zellen und Gewebe bei.

Während dieser Studien konnten tiefgehende Einblicke in das komplexe Wechselspiel der BMP2-abhängigen Signalkomponenten während der chondro-/osteogenen Entwicklung gewonnen werden. Offen bleibt zweifellos, inwieweit andere BMP-Rezeptoren, wie Aktivin Typ I und Typ II Rezeptoren und vor allem der BMP Typ II Rezeptor, an den induktiven Differenzierungsprozessen beteiligt sind und inwiefern diese Komponenten im Hinblick auf ihre temporäre und spatiale Expression im sich entwickelnden Embryo letztendlich wechselwirken.

Weiterhin zeigen hier diese ersten Studien die wichtige Rolle von Pex als PTH-spaltende Endopeptidase in der chondro-/osteogenen Differenzierung mesenchymaler Zellen auf. Eine weitergehende Charakterisierung von Pex als putatives Markergen der Differenzierung und als möglicher Regulator des chondro-/osteogenen Übergangs in der endochondralen Ossifikation wird angestrebt beziehungsweise wurde bereits begonnen.

## 5 Methoden

### 5.1 Allgemeine Methoden zur Subklonierung von DNA [Maniatis, 1989]

#### 5.1.1 Agarosegelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe werden Agarosegele in Konzentrationen von 0,5 % bis 2,0 % eingesetzt. Dafür löst man Agarose durch Kochen in 100 ml 1x TA-Laufpuffer (400 mM Tris-Acetat; 20 mM EDTA; pH 8,0) und gibt Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml hinzu. Die warme Agarose wird in eine entsprechende Gelkammer gegeben. Nach dem Erkalten des Gels und somit der Ausbildung der Gelmatrix wird die Elektrophoreseapparatur mit TA-Laufpuffer gefüllt, so daß das Gel mit Laufpuffer bedeckt ist. Die Proben werden mit 1/10 Volumen 10x Auftragepuffer (20% Ficoll, 0,1% Orange-G in TE) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die ideale Laufbedingung beträgt 5 Volt pro cm. Nach der Gelelektrophorese wird das Gel unter UV-Licht durch einen Rotfilter photographisch dokumentiert; hierbei können DNA-Fragmente ab circa 20 ng visuell wahrgenommen werden.

#### 5.1.2 Restriktion von DNA

DNA kann mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten werden; die Restriktionsendonukleasen lösen hierbei die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden, so daß DNA-Enden mit einer 3'-Hydroxyl- und einer 5'-Phosphatgruppe entstehen. Die Spaltung kann abhängig vom eingesetzten Enzym in überhängenden oder stumpfen DNA-Enden resultieren. Spaltungen von DNA mit Restriktionsendonukleasen werden in der Regel in 10-20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM DTT durchgeführt. Je nach eingesetztem Enzym werden die Ansätze mit 0-150 mM NaCl versetzt. Dieser Restriktionspuffer variiert von Enzym zu Enzym. Für einen Standard Restriktionsverdau werden bei einem Endvolumen von 20 µl maximal 4 µg DNA, 2µl 10x Restriktionspuffer und 5-10 U Enzym eingesetzt. Der Ansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt.

Der Verdau wird für 2 Stunden bei 37°C inkubiert, um nachfolgend mittels eines 1%igen Agarosegels analysiert zu werden.

Soll die geschnittene DNA für weitere Reaktionen eingesetzt werden, so besteht die Möglichkeit, die Restriktionsenzyme durch 10 minütiges Erhitzen auf 65°C zu deaktivieren; alternativ durch Zugabe von EDTA (0,5 µl 0,5 M EDTA; Endkonzentration: 12,5 mM).

#### 5.1.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

##### 5.1.3.1 Elution von DNA-Fragmenten aus LMP-Agarose nach Jet-Sorb<sub>Genomed</sub>

Die zu eluierenden DNA-Fragmente werden elektrophoretisch in einem 1%igem LMP-Agarosegel (*Low-Melting-Point* Agarose) aufgetrennt und mit Hilfe eines Skalpell unter UV-Licht aus dem LMP-Gel ausgeschnitten. Es ist das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstücks zu ermitteln. Das Gelfragment wird in ein Eppendorfgefäß überführt, um mit dem Jet-Sorb Kit eluiert zu werden (Genomed; Kat.Nr.: 110150).

Bei Gelgewichten unterhalb 100 mg wird das Gelfragment in 300 µl Puffer A1 (konz. NaClO<sub>4</sub>; TBE; NaAc) suspendiert und mit 10 µl Jet Sorb-Suspension (Kapazität des Harzes hinsichtlich DNA-Bindung: 7,5 µg pro 10 µl Suspension) versetzt, um für 15 min. bei 50°C inkubiert zu werden. Während der Inkubationszeit wird alle 3 min. gevortext, um eine Sedimentation des Harzes zu verhindern. Das Harz wird nach der Inkubation durch Zentrifugation für 30 sek. bei 13000 rpm sedimentiert. Nach der DNA-Bindung erfolgen Waschschrte, in denen das Pellet in 300 µl Puffer A1 resuspendiert und erneut für 30 sek. bei 13000 rpm zentrifugiert wird. Nach der Zentrifugation wird das Pellet in 300 µl Puffer A2 (EtOH; NaCl; EDTA; Tris/HCl) aufgenommen, resuspendiert und für 30 sek. bei 13000 rpm zentrifugiert; dieser Vorgang wird einmal wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Pellet an der Luft getrocknet, bis es schneeweiß ist und in 30 µl TE (10/1 oder 10/0,1) aufgenommen. Zur Lösung der DNA wird für 5 min. bei 50°C inkubiert, wobei während der Inkubation einmal gevortext wird. Zur Abtrennung des Harzes wird für 30 sek. bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut 30 sek. bei 13000 rpm zentrifugiert. Der resultierende Überstand enthält das gewünschte Fragment.

#### **5.1.3.2 Elution von DNA-Fragmenten aus LMP-Agarose nach Wizard PCR Preps DNA Purification System**

Die zu eluierenden DNA-Fragmente werden elektrophoretisch in einem 1%igem LMP-Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe eines Skalpell unter UV-Licht aus dem LMP-Gel ausgeschnitten. Es ist das Gewicht des ausgeschnittenen Gelstücks zu ermitteln. Das Gelfragment wird in ein Eppendorfgefäß überführt und mit dem Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega, Kat.Nr.: A7170) aufgereinigt.

Das ausgeschnittene Gelfragment sollte ein Gewicht von 300 mg nicht überschreiten. Zur Lösung der Agarose wird das Fragment auf 70°C erhitzt. Zur Bindung der DNA wird das Gel mit 1 ml des Harzes versetzt, für 20 Sekunden geschüttelt und auf die Säule gegeben, indem die Suspension in eine entsprechende Einwegspritze überführt und mittels des Stempels langsam durch das Säulenmaterial gedrückt wird. Nach dieser Methode wird die Säule mit 2 ml 80% Isopropanol gewaschen und über Zentrifugation bei RT für 2 min. bei 10000 g getrocknet. Die Elution erfolgt mit 50 µl TE (10/1; 10/0,1) bei 65°C, indem das TE direkt auf die Säule gegeben, eine Minute inkubiert und anschließend bei RT für 20 sek. bei 10000 g zentrifugiert wird. Das Eluat kann für alle weiteren Reaktionen direkt eingesetzt werden.

Analog zu dieser Prozedur können PCR-Produkte direkt aus dem Reaktionsansatz aufgereinigt werden, indem 30 bis 300 µl des PCR-Reaktionsansatzes mit 100 µl „Purification Buffer“ (50 mM KCl; 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1% Triton X-100) versetzt und vorsichtig gevortext werden. Durch Zugabe von 1 ml des Harzes erfolgt die Bindung der DNA; hierbei ist der Ansatz für 1 min. bei RT zu inkubieren und während dieser Zeit zwei- bis dreimal zu vortexen. Der Ansatz wird auf die Säule gegeben und wie oben beschrieben prozessiert.

### 5.1.4 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden

#### 5.1.4.1 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Das Klenow-Fragment der *E.coli* DNA-Polymerase I zeigt 5'→3'-Polymerase- und 3'→5'-Exonukleaseaktivität. Aufgrund dieser Aktivitäten wird das Klenow-Fragment eingesetzt, um überhängende 5'-DNA-Enden aufzufüllen. Die 3'→5'-Exonukleaseaktivität bietet die Möglichkeit, überhängende 3'-DNA-Enden in Anwesenheit von Nukleotiden abzdauen, so daß stumpfe DNA-Enden entstehen.

Das Enzym ist in nahezu allen Restriktionsenzym-Puffern aktiv, so daß in einem 20 µl Ansatz 4 µg geschnittene DNA, 2 µl Restriktionspuffer, 1 µl dNTP's (0,5 mM) und 5 U Klenow-Fragment bei 30°C für 1 h stumpfe DNA-Enden erzeugt werden. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz für 10 min. auf 75°C erhitzt oder mit 1 µl 0,5 M EDTA versetzt.

#### 5.1.4.2 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase

Die T4-DNA-Polymerase -Gen 43-Produkt des Bakteriophagen T<sub>4</sub>- zeigt neben der Polymeraseaktivität eine äußerst effiziente 3'→5' Exonukleaseaktivität hinsichtlich einzel- und doppelsträngiger DNA; eine 5'→3' Exonukleaseaktivität fehlt.

Die T4-DNA-Polymerase wird zum Generieren von stumpfen DNA-Enden bei vorliegenden 3'- oder 5'-überhängenden DNA-Enden eingesetzt.

Das Enzym ist in nahezu allen Restriktionsenzym-Puffern aktiv, so daß in einem 20 µl Ansatz 2 µg geschnittene DNA, 2 µl Restriktionspuffer, 40 µM dNTP's und 4 U T4-DNA-Polymerase bei 11°C für 1 h inkubiert werden, um stumpfe DNA-Enden zu erzeugen. Zur Inaktivierung des Enzyms wird der Ansatz für 10 min. auf 75°C erhitzt oder mit 1 µl 0,5 M EDTA versetzt.

### 5.1.5 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Zur Dephosphorylierung von 5' DNA-Enden -stumpfe oder überhängende DNA Enden- wird alkalische Phosphatase eingesetzt (Shrimp Alkaline Phosphatase, USB, Kat.Nr.:E70092Y).

Für die Reaktion werden 5 µg der zu dephosphorylierenden DNA in 1x Alkalische Phosphatase Puffer (200 mM Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM MgCl<sub>2</sub>) gegeben, mit 5 U alkalische Phosphatase versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Deaktivierung des Enzyms wird der Reaktionsansatz für 15 min. auf 65°C erhitzt.

Der Ansatz kann zur Entfernung des Enzyms mit Phenol/Chloroform extrahiert und anschließend gefällt werden (Kapitel 5.2.2).

### 5.1.6 Phosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Zur Phosphorylierung der 5'-DNA-Enden von einzel- oder doppelsträngiger DNA wird die T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase (Biolabs, Kat.Nr.: #201S) eingesetzt, die die γ-Phosphatgruppe des ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe der nicht-phosphorylierten DNA-Enden überträgt.

Für die Phosphorylierungsreaktion werden 500 pM DNA-Enden mit 1 µl 10 mM ATP, 1 µl 10x Kinasepuffer (70 mM Tris/HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM DTT), 1 µl 10 mg/ml BSA und 1 µl T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase (10 U) versetzt, um mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10 µl eingestellt zu werden. Nach einer Inkubation bei 37°C für ½ Stunde wird das Enzym durch 5 min. Erhitzen auf 70°C deaktiviert.

### 5.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA Fragmenten wurde das Ready-To-Go T4 DNA Ligase Kit (Pharmacia, Kat.Nr.: 27-0361-01) eingesetzt, um Ligationen stumpfer oder überhängender DNA Enden durchzuführen. DNA-Fragmente werden durch Verknüpfung der 3'-Hydroxylgruppe der Desoxyribose eines Nukleotids mit dem 5'-Phosphatrest der Desoxyribose eines anderen Nukleotids durch T<sub>4</sub>-DNA-Ligase verbunden.

Für die Ligation stumpfer DNA-Enden wird der gewünschte Vektor zunächst mit Restriktionsenzymen geschnitten, so daß die Insertionsstelle für das einzuklonierende DNA-Fragment als „freie“ DNA-Enden vorliegt. Die überstehenden DNA-Enden werden mit Klenow-Enzym abgedaut respektive aufgefüllt, so daß stumpfe DNA-Enden vorliegen. Um eine Religation des Vektors zu vermeiden, werden die 5'-Enden der DNA dephosphoryliert. Analog wird das einzuklonierende Fragment behandelt, allerdings entfällt hier die Dephosphorylierung der 5' DNA-Enden. Für die Ligationsreaktion werden die prozessierte Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:4 (Ligationsansatz: 200 ng bis 1000 ng Gesamt-DNA) in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Mit dieser Lösung wird der getrocknete Ligationsmix (66 mM Tris/HCl, pH 7,6; 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,1 mM ATP; 0,1 mM Spermidin; 10 mM DTT; 6 U<sub>weiss</sub> T<sub>4</sub>-DNA Ligase; Stabilisatoren) versetzt und gelöst. Die Ligationsreaktion ist über Nacht bei 16°C durchzuführen.

Zur Ligation von überhängenden DNA-Enden werden DNA-Fragmente mit überhängenden 5'- oder 3'-DNA-Enden eingesetzt. Der Vektor wird wie beschrieben mit Restriktionsenzymen gespalten und dephosphoryliert; das Fragment wird ebenfalls mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, so daß Vektor und Insert komplementäre DNA-Enden aufweisen. Für die Ligationsreaktion werden die prozessierte Vektor- und Insert-DNA in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:4 (200 ng bis 500 ng Gesamt-DNA) in ein Reaktionsgefäß gegeben und ebenfalls mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Die Ligationsreaktion erfolgt analog zur Ligation stumpfer DNA-Enden.

Zur Entfernung der Salze wird der Ligationsansatz mit 0,5 Vol. 4M NaCl und 0,6 Vol. Isopropanol versetzt, 1 h bei -70°C inkubiert und 1 h bei 4°C und 20000 g zentrifugiert. Das Pellet wird 2 mal mit 70% Ethanol gewaschen, in TE (10/1 oder 10/0,1) aufgenommen und zur Elektroporation eingesetzt.

## **5.2 Allgemeine Methoden zum Arbeiten mit DNA**

### **5.2.1 Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration**

DNA und RNA zeigen bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm ein Absorptionsmaximum, welches genutzt wird, um die Konzentration der entsprechenden DNA- oder RNA-Lösung zu bestimmen. Zur Bestimmung der Konzentration wird die Lösung dahingehend mit TE oder H<sub>2</sub>O verdünnt, so daß die Extinktion der Lösung bei  $\lambda = 260$  nm im linearen Bereich gemessen werden kann (OD = 0,1 - 1,0). Als Blind- oder Nullwert wird das Lösungsmittel eingesetzt. Nach der Messung der optischen Dichte kann die Konzentration der Lösung bestimmt werden. Für dsDNA gilt, daß eine OD von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml und für ssRNA einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Desweiteren kann die Reinheit der Proben ermittelt werden, indem die Extinktion bei  $\lambda = 280$  nm bestimmt wird, um den Proteinanteil zu bestimmen; der Quotient OD 260/280 gilt als Maß für die Reinheit der DNA- oder RNA-Probe.

### **5.2.2 Natrium-/Ammoniumsalz-Alkohol Fällung von DNA**

Zu der zu fällenden DNA-Lösung werden 1/10 Vol. 3 M NaAc, pH 6 bzw. 7,5 M NH<sub>4</sub>Ac und 2,5 Vol. 100% EtOH bzw. Isopropanol gegeben und für 10 bis 20 min. bei -70°C inkubiert. Danach erfolgt das Abzentrifugieren der gefällten DNA bei 4°C, 13000 g für 30 min. bis 1 h. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen; es werden je nach Größe des Pellets 1 bis 5 ml Ethanol hinzugegeben und für 5 min. bei 13000 g zentrifugiert. Mit Hilfe einer ausgezogenen Pasteurpipette wird das Ethanol möglichst quantitativ abgesaugt, um das verbleibende Pellet über Speed Vac, Wasserstrahlpumpe oder an der Luft zu trocknen. Das getrocknete Pellet wird in TE (10/1 oder 10/0,1) aufgenommen.

### **5.2.3 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung von Proteinen**

Zunächst wird die einzusetzende DNA-Lösung auf 2 ml Eppendorfgefäße verteilt, um ein gut handhabbares Volumen zu erhalten; sollte dieses aufgrund der Menge nicht möglich sein, so können Corex-Röhrchen eingesetzt werden.

Zu der DNA-Lösung wird das gleiche Volumen eines Gemisches aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 gegeben, kräftig gevortext und 30 sek. bei 13000 g zentrifugiert. Die ausgefallenen Proteine werden als weißer Niederschlag in der Interphase sichtbar. Die obere, wässrige Phase wird vorsichtig abgezogen. Die Prozedur wird so lange wiederholt, bis keine Fällung an Proteinen mehr beobachtet werden kann. Die wässrige DNA-Lösung wird mittels Natriumacetat und Ethanol gefällt.

### 5.2.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Der Polymerase-Kettenreaktion liegt die spezifische Bindung und Verlängerung zweier der zu amplifizierenden DNA oder cDNA komplementären Oligonukleotide zugrunde. Diese Oligonukleotide flankieren 5' und 3' den zu amplifizierenden DNA-Bereich. Nach der Denaturierung der DNA hybridisiert jedes Oligonukleotid komplementär mit je einem der beiden DNA-Stränge. In der anschließenden DNA-Synthese durch die thermostabile Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) werden die Oligonukleotide gemäß des komplementären Stranges verlängert, wobei die Syntheserichtungen der beiden Oligonukleotide gegeneinander gerichtet sind. Diese drei Schritte -Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligonukleotide und DNA-Synthese- stellen einen PCR-Zyklus dar. Durch Wiederholung der Zyklen wird eine exponentielle Amplifikation des durch Oligonukleotide flankierten DNA-Abschnitts erzielt, wobei stumpfe DNA-Enden oder Einzel-3'-A-Überhänge erzeugt werden.

Als Standard-PCR-Reaktionsansatz wurde pro PCR-Reaktion mindestens 10 ng DNA eingesetzt. Zu der DNA werden in einem PCR-Reaktionsgefäß 2 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl; 100 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,01% Gelatine), 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTPs (10 mM), 1 µl Oligonukleotide (5 pmol) und 1 U Taq-Polymerase (Promega, Kat.Nr.: M1861A) gegeben. Mit H<sub>2</sub>O ist der Ansatz auf ein Endvolumen von 20 µl aufzufüllen und bis zur Reaktion auf Eis zu halten.

Ein Standardreaktionszyklus geht von einer Denaturierung bei 94°C für 15 sek., einer Hybridisierung der Oligonukleotide bei einer für die Oligonukleotide spezifischen Temperatur für 15 sek. und einer DNA-Synthesereaktion bei 72°C für 15 sek. aus; dieser Zyklus wird insgesamt 30 mal wiederholt. Den Amplifikationszyklen geht eine Denaturierungsphase von einer Minute bei 94°C voraus, um eine vollständige Denaturierung der Ausgangs-DNA zu gewähren. Abschließend wird der Ansatz für 3 min. bei 72°C belassen, um nicht vollständig synthetisierte DNA-Fragmente zu komplettieren.

Die Analyse der PCR-Reaktion erfolgt auf einem 1%igen Agarosegel.

### 5.2.5 cDNA-Klonierung und zielgerichtete Mutagenese

#### 5.2.5.1 cDNA-Klonierung

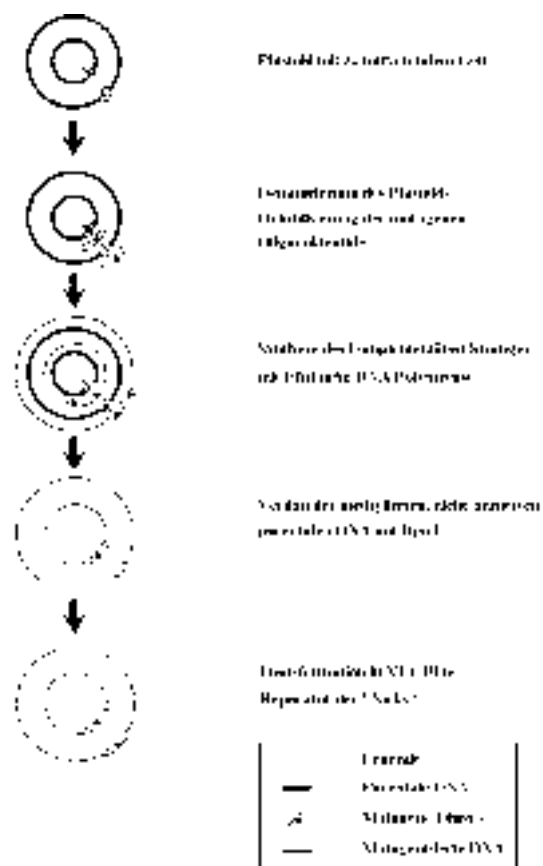
Zur Klonierung von distinkten Genen oder Genabschnitten einer cDNA-Population sowie von spezifischen DNA-Sequenzen vorgegebener DNA (z.B. Plasmid-DNA) wird hier das Prinzip der Polymerase Kettenreaktion verwendet. Spezifische Oligonukleotide, die den zu klonierenden DNA-Abschnitt flankieren, dienen hierbei ebenfalls zur Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments. Die eingesetzten Oligonukleotide können im 5'-Bereich nicht-komplementäre Sequenzen aufweisen, so daß ein zielgerichteter Austausch von Nukleotiden im PCR-Amplifikat ermöglicht wird; hier wären beispielsweise der Einbau von Restriktionschnittstellen, vorzeitigen Stop-Codons, „Tags“ oder Punktmutationen zum Aminosäureaustausch zu nennen.

Für die PCR-Reaktion zur Klonierung wird das „Expand High Fidelity PCR System“ der Firma Boehringer Mannheim (Kat.Nr.: 1732641) verwendet. Die cDNA oder Plasmid-DNA wird in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 2 µl 10x Puffer, 2 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl dNTP's (10 mM), 2 µl Oligonukleotide (5 pmol) versetzt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Während der Hybridisierungsphase der Oligonukleotide in der Prä-PCR wird 1 µl des Enzymmixes (Taq-DNA Polymerase/Pwo-DNA-Polymerase, 3,5 U/µl) hinzugegeben. Die Prä-PCR besteht aus einer 5 min. Denaturierungsphase bei 94°C, einer 2 min. Hybridisierungsphase bei der entsprechenden Bindungstemperatur und einem ausgedehnten Syntheseschritt für 40 min. bei 72°C. Nachfolgend wird die Amplifikationsphase mit 35 Zyklen

angeschlossen, wobei die Denaturierung bei 94°C für 45 sek., die Hybridisierung bei entsprechender Bindungstemperatur für 45 sek. und die Synthese bei 72°C für 2 min. durchgeführt wird. Abschließend erfolgt für 10 min ein weiterer Syntheseschritt bei 72°C. Das Amplifikat wird über ein LMP-Agarosegel aufgereinigt, eluiert (Kapitel 5.1.3) und direkt für das TA-Cloning (Kapitel 5.2.6) eingesetzt.

### 5.2.5.2 Zielgerichtete Mutagenese

Zum Austausch von Nukleotiden zur zielgerichteten Mutagenese wird das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene (Kat.Nr.: #200518) eingesetzt. Hierbei dienen ein entsprechendes Oligonukleotid und sein revers komplementäres Pendant, welche neben komplementären Bereichen zentral nicht-komplementäre, geänderte Nukleotide aufweisen, als Ausgangspunkt zur jeweils komplementären Synthese der Plasmidstränge durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase. Nach zyklischer Synthese der mutierten DNA-Stränge werden die parentalen, methylierten Stränge durch ein entsprechendes Restriktionsenzym geschnitten (Abbildung 5.1). Mit dieser Methode können Punktmutationen, Aminosäureaustausche, Deletionen und Insertionen in doppelsträngigen Plasmiden eingeführt werden.



**Abbildung 5.1:** Schematische Darstellung der Mutagenese mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit



Zur Mutagenese werden 50 ng des zu mutierenden Plasmids, 5 µl 10x Puffer (100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>, 200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 mg/ml BSA), jeweils 125 ng der Oligonukleotide („*forward*“ und „*revers*“) und 1 µl dNTP in einem PCR-Reaktionsgefäß mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 µl eingestellt. Der Reaktionsansatz wird mit 2,5 U Pfu-Turbo DNA-Polymerase versetzt, gemischt und mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktion wird in einem PCR-Gerät mit 1 min. Denaturierung und 12 Zyklen mit 30 sek. Denaturierung bei 95°C, 1 min. Oligonukleotid-Hybridisierung bei der entsprechenden Bindungstemperatur und 2 min. pro Kb des Plasmids zur Synthese des kompletären Stranges durchgeführt. Im Anschluß an die Mutagenesereaktion erfolgt der Verdau der parentalen Plasmid-DNA durch Zugabe von 10 U des Restriktionsenzym Dpn I; der Verdau wird für 1 h bei 37°C durchgeführt. Für die Transformation der kompetenten Epicurian Coli XL1-Blue Zellen (Kapitel 5.3.4.2) wird 1 µl des Reaktionsansatzes eingesetzt.

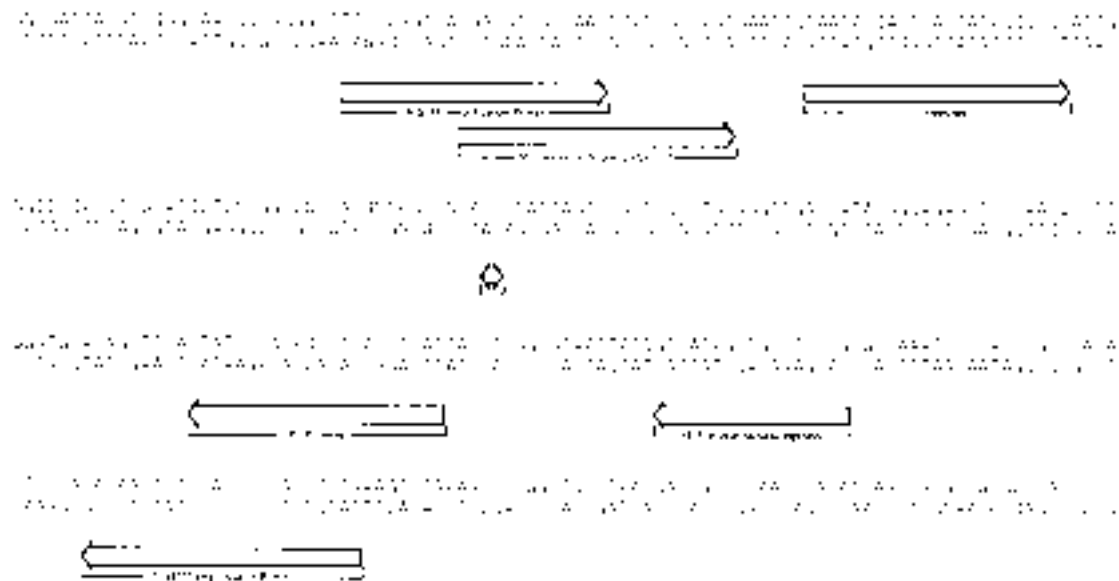
### 5.2.6 Klonierung von PCR-Produkten / „TA-Cloning“

Die zu klonierenden Genfragmente werden aus entsprechenden cDNA-Proben mittels spezifischer Oligonukleotide über eine PCR-Reaktion (Kapitel 5.2.4, 5.2.5) amplifiziert; die eingesetzte Taq-Polymerase erzeugt hierbei einzelne 3'-A-Überhänge. Diese Produkte können über eine Ligation von überhängenden DNA-Enden in T-Vektoren, die 5'-T-Überhänge an der Klonierungsstelle aufweisen, eingebracht werden.

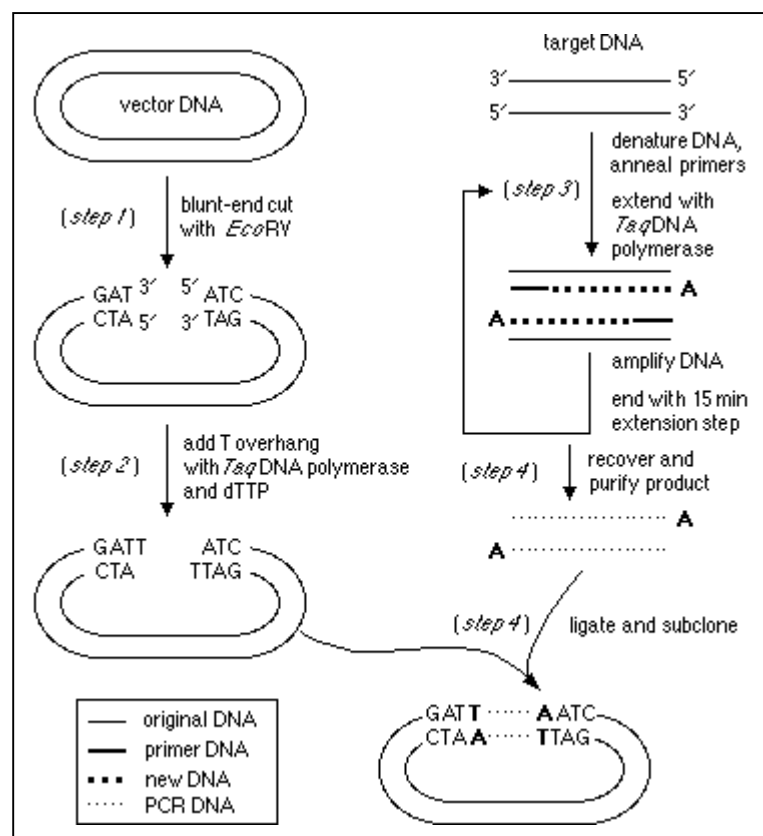
Für die durchgeführten Klonierungen wurde das pGEM-T Vector System der Firma Promega (Kat.Nr.: A3600) eingesetzt (Abbildung 5.3).

Direkt nach dem Abschluß der PCR-Reaktion oder nach Aufreinigung des gewünschten Fragmentes über ein LMP-Agarosegel wird die Ligation angesetzt; 50 ng des pGEM-T Vektors werden mit 1-1,5 µl des PCR-Reaktionsansatzes oder einer entsprechenden Menge an aufgereinigtem DNA-Fragment, 1 µl 10x T4-DNA-Ligase Puffer (300 mM Tris-HCl, pH 7,5; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 Unit<sub>Weiss</sub> T4 DNA Ligase versetzt. Der Ligationsansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10 µl eingestellt und über Nacht bei 4°-8°C inkubiert.

Für die Transformation kompetenter E.coli SURE wird 1 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die resultierenden Klone können mittels einer PCR-Reaktion (Abbildung 5.2) auf Insertionen geprüft werden. Für diese „*in situ*-insert amplification“-PCR wird mit einem sterilen Zahnstocher der Klon aufgenommen und in 20 µl TE (10/1 oder 10/0,1) geschwenkt. 10 µl der Bakteriensuspension dienen als Ausgangsmaterial für die nachfolgende PCR-Reaktion mit Oligonukleotiden zur „*in situ*-Amplifikation“ (Kapitel 7.1.2.). Diejenigen Klone, die eine Insertion aufweisen, dienen zur Präparation von Plasmid-DNA (Kapitel 5.3.5).



**Abbildung 5.2:** Ausschnitt des pGEM-T Vektor<sub>Promega</sub> im Bereich der TA-Klonierungsstelle mit Angabe der verwendeten Oligonukleotidbindungsstellen



**Abbildung 5.3:** Schematische Übersicht zum „TA-Cloning“ aus Current Protocols in Molecular Biology, 1998

### 5.2.7 Sequenzierung von DNA mit dem „ALF“ Pharmacia

Das „*Cycle-Sequencing*“ basiert auf der Didesoxy-Methode nach Sanger, 1977. Diese Methode zielt darauf ab, daß eine thermostabile DNA-Polymerase komplementär zur Ausgangs-ssDNA nach der Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotids eine Kopie synthetisiert, welche durch den Einbau eines Didesoxy-Nucleotids (2,3-didesoxynukleosid-Triphosphat) terminiert wird, wobei statistisch betrachtet in dem Reaktionsansatz nach dem Einbau von ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP die Synthese abgebrochen wird. In den Reaktionsansätzen für A, C, G und T entstehen Populationen von Fragmenten, die sich jeweils in ihrer Größe unterscheiden. Die Fragmente werden in einem denaturierenden Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Mittels der Fluoreszenz-Markierung der eingesetzten Oligonukleotide können nun die einzelnen Fragmente detektiert und der Basenabfolge zugeordnet werden.

#### 5.2.7.1 Gelpräparation

Die Glasplatten des Sequenziergels werden sorgfältig gereinigt, zunächst mit deionisiertem Wasser, mit Ethanol und abschließend wiederum mit deionisiertem Wasser. Vor der Behandlung der Platten mit Ethanol wird die Geltaschenfläche der geätzten Platte silanisiert (500 µl EtOH; 2 µl Bindsilan; 125 µl 10% CH<sub>3</sub>COOH).

Die „*Spacer*“ werden auf die Seitenflächen der Temperierplatte aufgelegt, wobei der Lichtkoppler zwischen den geteilten „*Spacern*“ im unteren Bereich der Platte plaziert wird, so daß er mit den „*Spacern*“ bündig abschließt. Nach dem Auflegen der geätzten Platte werden die Schraubklemmen an den vorgesehenen Stellen befestigt.

Die Gellösung (33,6g Harnstoff; 9,6 ml 10x TBE; 17,6 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (29:1); mit deionisiertem H<sub>2</sub>O auf 80 ml auffüllen) wird durch eine 0,22 µm Filtriereinheit mittels einer Wasserstrahlpumpe genutscht und durch Zugabe von 70 µl TEMED und 300 µl 10% (w/v) APS in H<sub>2</sub>O zur Polymerisation aktiviert. Die Gellösung wird gleichmäßig zwischen die Glasplatten verteilt, etwaige Luftblasen werden entfernt und der Geltaschenkamm eingesetzt; durch zwei Klammern wird der Geltaschenkamm fixiert. Das Gel wird für mindestens 1,5 Stunden polymerisiert. Danach wird der Geltaschenkamm vorsichtig entfernt und die ausgesparten Taschen begradigt. Die obere Pufferkammer wird befestigt und die Gelapparatur im ALF-Sequencer plaziert und fixiert. Dabei ist zu beachten, daß der Laserstrahl dahingehend justiert wird, daß er über den Detektoren verläuft. Die Pufferkammern werden mit TBE - Puffer gefüllt.

#### 5.2.7.2 „*Cycle*“-Sequenzierreaktion

Für die Sequenzierung werden 0,5 bis 1,0 µg DNA mit 2,0 µl 10x Puffer (120 mM Tris; 40 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; pH 9,5), 1 µl Fluoreszenz-markierte Oligonukleotide (2 pmol), 3,0 µl dNTP (1mM [dATP, dCTP, dTTP, 7deaza-dGTP] Stocklösung) und 0,16 µl Taquenase/PPase (5U Taquenase / 1U PPase; Amersham Life Science, Inc. Thermosequenase; Kat.Nr.: E79000Y) versetzt und auf ein Endvolumen von 20µl mit H<sub>2</sub>O eingestellt. Aliquots von jeweils 5 µl werden in einem PCR-Reaktionsgefäß mit 2 µl Didesoxynukleotidlösung (5 µM ddATP, 5 µM ddCTP, 3,75 µM ddGTP, 5µM ddTTP pro 2 µl) versetzt und auf Eis gehalten.

Die Sequenzierreaktion umfaßt einen Denaturierungsschritt von 2 min. bei 94°C, 36 Zyklen mit 15 sek. Denaturierung bei 94°C, 15 sek. Oligonukleotidbindung bei der optimalen „Annealing“-Temperatur und einen Syntheseschritt von 40 sek. bei 72°C. Abschließend erfolgt ein weiterer Syntheseschritt bei 72°C für 5 min. Die Sequenzierreaktion wird mit 4 µl Stopplösung (95% Formamid, 10mM NaOH, 0,005% Bromphenolblau) beendet.

Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proben für 2-3 Minuten bei 95°C denaturiert, um bis zum Auftragen auf Eis gelagert zu werden.

Nach einem 20 minütigen Vorlauf und dem Auftragen der Proben werden diese für 8 Stunden bei 50°C, 1500 Volt und 35 mA aufgetrennt. Die erzielten Rohdaten können entsprechend der ALF-Software (ALF-Manager 3.01) prozessiert und ausgewertet werden.

### 5.2.8 Fluorescein-Markierung von Oligonukleotiden

Mit dem „FluoroAMP T4-Kinase Green Oligonucleotide Labeling System“ können Oligonukleotide für die Sequenzierung mit dem „ALF“ mit Fluorescein markiert werden. Die Markierung erfolgt am 5'-Ende des Oligonukleotids und stellt eine zweistufige Modifikation des Oligonukleotids dar (Promega, Kat.Nr.: F1680).

Zunächst wird mittels der T<sub>4</sub>-Kinase das 5'-Ende des Oligonukleotids mit ATP-S (Adenosin- $\gamma$ -thiotriphosphat) phosphoryliert. In der Anschlußreaktion wird eine kovalente Bindung zwischen dem reaktiven Schwefel und Maleimid-Flourescein geknüpft (Abbildung 5.4). Das markierte Oligonukleotid ist zur Sequenzierung mit dem „ALF“ einsetzbar.

Für die Markierungsreaktion werden 8 nmol Oligonukleotide eingesetzt; die Konzentration sollte zwischen 1 und 2 nmol/µl betragen. Vor der Phosphorylierungsreaktion werden die Oligonukleotide für 5 Minuten bei 95°C denaturiert, um anschließend auf Eis gehalten zu werden. Zur Phosphorylierung werden die Oligonukleotide mit 2,5 µl Kinase-10x-Puffer (700 mM Tris/HCl, pH 7,6; 100 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM DTT), 1 µl 100 mM  $\gamma$ -S-ATP und 100 U T<sub>4</sub>-Kinase versetzt. Der Reaktionsansatz wird mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 25 µl aufgefüllt und für 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der Oligonukleotide ist der Reaktionsansatz mit 2,5 µl Oligo-Präzipitationslösung und 80 µl 95% EtOH (-20°C) zu versetzen und für 5 Minuten bei 13000 g zu zentrifugieren; nach der Zentrifugation wird das Pellet mit 250 µl 70% EtOH (-20°C) gewaschen. Die thiophosphorylierten Oligonukleotide werden zur Fluorescein-Kopplung mit 2,5 µl Maleimid-Fluorescein-Lösung (50 µg Maleimid-Fluorescein in 5 µl DMSO) versetzt und für ½ Stunde bei 68°C inkubiert, um danach erneut mit 2,5 µl Maleimid-Fluorescein-Lösung versetzt und für eine weitere Stunde bei 68°C inkubiert zu werden. Zur Fällung wird der Reaktionsansatz mit 5 µl Oligo-Präzipitationslösung, 100 µl 95% EtOH (-20°C) und 50 µl N,N-Di-methylformamid versetzt und für 5 min. bei 13000 rpm zentrifugiert (alternativ kann die Fällung auch mit 3 M NaAc und 95% EtOH durchgeführt werden).

Das Pellet wird nicht mit 70% EtOH gewaschen, sondern ist direkt in 100µl TE (10/1 oder 10/0,1) aufzunehmen. Die Probe wird über eine G50-Sephadex-Säule entsalzt. Die erste Fraktion enthält die markierten Oligonukleotide, welche mit TE (10/1 oder 10/0,1) auf ein Endvolumen von 500 µl eingestellt werden.

Die Fraktion ist photometrisch bei  $\lambda = 260$  nm und  $\lambda = 494$  nm zu vermessen, um die Oligonukleotidkonzentration und den Grad der Markierung mit Fluorescein zu bestimmen.

Zur Bestimmung der Oligonukleotidkonzentration an markierten Oligonukleotiden ist folgende Formel zu verwenden:

$$c = (A_{260} \cdot VF - 0,35 \cdot A_{494} \cdot VF) \cdot 10^6 / N \cdot 10000 \text{ pmol}/\mu\text{l}$$

Zur Bestimmung der Kopplungseffizienz wird folgende Formel eingesetzt:

$$\text{DOS} = N \cdot 10000 \cdot A_{494} / 65000 \cdot (A_{260} - 0,35 \cdot A_{494})$$

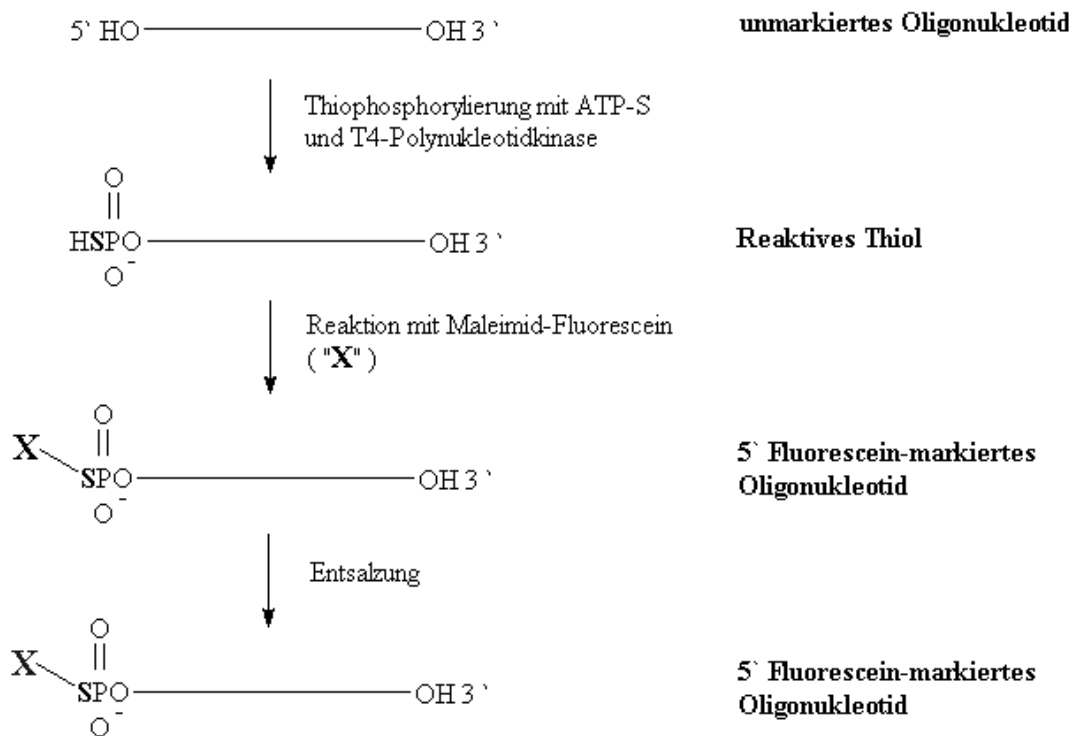
A = Absorption

DOS = Degree of Substitution

N = Länge des Oligonukleotids in bp

VF = Verdünnungsfaktor zur Photometrie

Das Verhältnis zwischen Fluorescein- und Oligonukleotidanteil (DOS) ist maßgebend für eine effiziente Markierung und sollte einen Wert von >0,7 ergeben; Oligonukleotide mit einem DOS-Wert von >0,7 eignen sich gut für die anschließende Sequenzierung mit dem „ALF“.



**Abbildung 5.4:** Reaktionsschema zur Fluorescein-Markierung von Oligonukleotiden zur Sequenzierung

### 5.3 Arbeiten mit *Escherichia coli*

#### 5.3.1 *E. coli* Stämme

**E. coli SURE** (Stop Unwanted Rearrangement Events) [Greener, 1990]  
 recB, recJ, sbC201, uvrC, umuC: Tn5 (kan<sup>R</sup>), mcrA, mcrB, mrr lac, Δ (hsdRMS), endA1, gyrA96, thi, relA1, supE44 [F', proAB, lacIqZ Δ M15 FN10 (tet<sup>R</sup>)]

**JM 109** (Promega, Kat.Nr.: L2001) [Messing, 1981]  
 recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (r<sub>K</sub>-, m<sub>K</sub>+), relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15]

**Epicurian Coli XL1-Blue** (Stratagene, Kat.Nr.: #200236)  
 recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacI<sup>q</sup>ZΔM15, Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]<sup>c</sup>

#### 5.3.2 Kulturmedien und Lösungen

<b>LB-Medium:</b>	10g/l Bacto-Trypton; 5g/l Bacto-Hefeextrakt; 5g/l NaCl
<b>TB-Medium:</b>	12 g/l Bacto-Trypton; 24 g/l Bacto-Hefeextrakt; 4 ml/l 87% Glycerin; 17 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 72 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
<b>SOB-Medium:</b>	2% ( w/v ) Bacto-Trypton; 0,5% (w/v) Bacto-Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub>
<b>SOC-Medium:</b>	SOB mit 20 mM Glucose (18μl 20% Glucose auf 1 ml SOB)
<b>NZY<sup>+</sup>-Medium:</b>	10g/l NZ-amin (Casein-Hydrolysat), 5g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl, pH 7,5 autoklavieren und mit 12,5 ml 1M MgCl <sub>2</sub> , 12,5 ml 1M MgSO <sub>4</sub> vor Gebrauch substituieren
<b>Agarplatten:</b>	LB - Medium; 15g/L Bacto Agar
<b>Ampicillin:</b>	Stammlösung: 25 mg/ml in 70% EtOH Arbeitskonzentration: 50 mg/l ( <i>E.coli</i> „SURE“) Arbeitskonzentration: 100 mg/l (JM109) Arbeitskonzentration: 50 mg/ml (Epicurian Coli XL1-Blue)
<b>Tetracyclin:</b>	Stammlösung: 5 mg/ml in 70% EtOH, vor Licht geschützt aufbewahren; Arbeitskonzentration: 10 mg/l ( <i>E.coli</i> „SURE“)

### 5.3.3 Herstellung kompetenter Zellen für Transformation mittels Elektroporation nach Dower, 1988

Die Bakterienkultur -hier: *E.coli* „SURE“- wird in 2 ml LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin über Nacht bei 37°C unter Belüftung kultiviert. Diese Vorkultur wird für 2x 500 ml LB-Flüssigmedium mit Tetracyclin in 2000 ml Erlenmeyerkolben mit Schikanen zum Animpfen eingesetzt und unter Belüftung bei 37°C kultiviert. Die Hauptkultur wird für 2-5 Stunden kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 bis 0,7 erreicht ist.

Die Zellen werden in Portionen á 250 ml in sterile Zentrifugengefäße überführt und auf Eis für 30 min. adaptiert. Die Bakterien werden mittels Zentrifugation -15 min., 4°C, 1500 g pelletiert. Das Pellet wird in 250 ml sterilem eiskaltem Wasser (kein Millipore !) aufgenommen und gründlich resuspendiert. Anschließend werden die Pellets in 100 ml sterilem eiskaltem Wasser resuspendiert, erneut zentrifugiert, um jeweils zwei der Pellets zu vereinen und in 100 ml sterilem eiskaltem Wasser aufzunehmen.

Nach weiterer Zentrifugation wird das verbleibende Pellet in 10 ml sterilem eiskaltem Glycerin (10 %; w/v) aufgenommen und abermals zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit 1 ml Glycerin versetzt und resuspendiert.

Die Bakteriensuspension wird in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und auf maximal 2 ml mit Glycerin aufgefüllt; die Zellsuspension ist hierbei ebenfalls auf Eis zu halten.

Aliquote á 50 µl werden in 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren, um bis zum Gebrauch bei -70°C gelagert zu werden.

### 5.3.4 Transformation kompetenter Bakterien

#### 5.3.4.1 Transformation kompetenter Bakterien mittels Elektroporation

Die kompetenten Zellen (*E.coli* „SURE“) werden grundsätzlich auf Eis gehalten. Zur Transformation werden 50 µl der Zellen mit 1 µl der zu transformierenden DNA (mindestens 1 ng) versetzt und mit der Pipettenspitze gemischt. Der Transformationsansatz wird für 1 min. auf Eis inkubiert, um blasenfrei in die Elektroporationsküvette gegeben zu werden. Die Küvette wird in die Elektroporationskammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) gestellt und für 4-5 sek. bei 2,5 kV/25µF am „Gene Pulser“ und 200 Ohm am „Pulse Controller“ elektroporiert. Direkt nach der Elektroporation wird umgehend 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium (ohne Antibiotika) in die Küvette gegeben, um letztendlich in ein Eppendorfgefäß überführt und für 1 h bei 37°C inkubiert zu werden. Die transformierten Zellen werden auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Mit dieser Methode können Transformationseffizienzen von bis zu 10<sup>10</sup> Transformanten pro µg zirkulärer Plasmid-DNA erzielt werden.

#### 5.3.4.2 Hitzeschocktransformation kompetenter Bakterien

Die kompetenten Zellen (*E.coli* JM109) werden grundsätzlich auf Eis gehalten. Zur Transformation werden 50 µl der Zellen mit 2 µl der zu transformierenden DNA versetzt und mit der Pipettenspitze gemischt. Der Transformationsansatz wird für 20 min. auf Eis gehalten, anschließend für 50 sek. einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, weitere 2 min. auf Eis inkubiert und mit 950 µl SOC-Medium (RT) versetzt. Die transformierten Zellen werden für 1,5 Stunden bei 37°C inkubiert, auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die kompetenten Zellen (Epicurian Coli XL1-Blue) werden grundsätzlich auf Eis gehalten. Zur Transformation werden 50 µl der Zellen mit 1 µl der zu transformierenden DNA versetzt und mit der Pipettenspitze gemischt. Der Transformationsansatz wird für 30 min. auf Eis gehalten, anschließend für 45 sek. einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt, weitere 2 min. auf Eis inkubiert und mit 500 µl NZY<sup>+</sup>-Medium (42°C) versetzt. Die transformierten Zellen werden für 1 h bei 37°C bei 250 rpm inkubiert, auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **5.3.5 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli**

#### **5.3.5.1 Präparation von Plasmiden im analytischen Maßstab**

(Klare Lysate/Mini Preps), [Birnboim und Doly, 1979]

Zunächst werden Klone, die nach Transformation mit dem Zielplasmid entstanden, mit Hilfe von sterilen Zahnstochern gepickt, auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen (Impfkultur zur Maxi-Prep Vorkultur) und letztendlich in 2 ml LB mit Antibiotikum überführt. Die Kultivierung erfolgt über Nacht bei 37°C unter Belüftung.

Am folgenden Tag wird die Zellsuspension in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und für 1 min. bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200 µl Suspensionspuffer (50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 4 mg/ml Lysozym, optional) resuspendiert und für 5 min. bei RT belassen, um daraufhin mit 400 µl frisch angesetzter Denaturierungslösung (0,2 N NaOH; 1% SDS (w/v)) versetzt zu werden. Eine Inkubation von 5 min. im Eisbad ermöglicht die Lyse der Zellen. Es folgt die Zugabe von 300 µl 7,5 M NH<sub>4</sub>OAc, woraufhin die Lösung gemischt wird. Zur Proteinfällung wird für 10 min. im Eisbad inkubiert. Zentrifugation für 10 min. bei 13000 rpm führt zu einem klaren Überstand, welcher in ein neues Eppendorfgefäß überführt wird.

Zur DNA-Fällung wird das Lysat mit 0,6 Vol. Isopropanol versetzt, für 15 min. bei -70°C belassen und anschließend für 10 min. bei 13000 g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 70% EtOH gewaschen, an der Luft getrocknet und in 100µl TE (10/1 oder 10/0,1) aufgenommen.

Es wird ein Restriktionsverdau mit entsprechenden Restriktionsenzymen vorgenommen, um zu überprüfen, ob die gepickten Klone das Plasmid von Interesse enthalten. Für diesen Verdau wird 1/10 der Mini-Prep DNA eingesetzt (10 µl).

#### **5.3.5.2 Präparation von Plasmiden im quantitativen Maßstab**

(Maxi Prep / Large Scale Prep)

Von der Impfkultur wird mit sterilen Zahnstochern morgens eine Vorkultur in 2-3 ml LB mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft, welche am Abend zum Animpfen der Hauptkultur dient.

Zum Animpfen der Hauptkultur werden 1-3 ml der Vorkultur in 250-500 ml TB versetzt mit 10% Phosphatpuffer (0,17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und Antibiotikum in einem 1 Liter-Erlenmeyerkolben mit Schikanen eingesetzt. Die Hauptkultur wird über Nacht unter Belüftung bei 37°C inkubiert.

Die Zellsuspension wird in adäquate Zentrifugenbecher (Beckmann für GS-3-Rotor) überführt und für 15 min. bei 6000 rpm und 4°C zentrifugiert. Zur weiteren Aufarbeitung der DNA wird das Jet-Star Kit 2.0 der Firma Genomed (Kat.Nr.: 220020) eingesetzt.

Die pelletierten Bakterien werden in 10 ml Suspensionslösung (50 mM Tris/HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100µg/ml RNase) aufgenommen und in 30 ml Corex-Röhrchen überführt. Die Suspension wird mit 10 ml Lysispuffer (0,2 N NaOH; 1% SDS (w/v)) versetzt, 5x



geschwenkt und für 5 min. bei RT inkubiert. Zur Neutralisation wird die Probe mit 10 ml Neutralisationslösung (3,2 M NaAc, pH 5,5) versetzt und 5x geschwenkt. Die Suspension wird daraufhin für 20 min. bei 20°C und 14000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Die Anionenaustauschersäule wird mit 30 ml Äquilibrationsslösung (600 mM NaCl; 100 mM NaAc, pH 5,5; 0,15% Triton-X-100) äquilibriert. Der Überstand wird auf die Säule gegeben und nach Durchfluß mit 60 ml Waschlösung (800 mM NaCl; 100 mM NaAc, pH 5,0) gewaschen. Die DNA wird durch 50°C warme Elutionslösung (100 mM Tris/HCl, pH 8,5; 250 mM NaCl) eluiert und in einem Corex-Röhrchen aufgefangen. Zur Präzipitation wird das Eluat mit 10,5 ml Isopropanol versetzt, für 10 min. bei -70°C inkubiert und für 1 h bei 4°C und 14000 g zentrifugiert. Das Pellet wird mit 5 ml 70% EtOH gewaschen und in 1500 µl TE (10/1 oder 10/0,1) aufgenommen.

Die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA wird photometrisch bestimmt.

## 5.4 Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

### 5.4.1 Zelllinie

*C3H10T½*: diploide Fibroblasten-Zelllinie auf Mausembryonen zurückzuführen [Reznikoff, 1973]; ATCC Nr.: CCL 226

### 5.4.2 Kulturmedien und Lösungen

<b>DMEM:</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium 13,63 g/l DMEM-Pulver; 44 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 10 mM HEPES Das Medium wird vor Gebrauch mit 1x Pen/Strep, 1x Glutamin und 10% FCS versetzt.
<b>100x Pen/Strep:</b>	6,06 mg/ml Ampicillin; 10 mg/ml Streptomycin
<b>100x Glutamin:</b>	200 mM L-Glutamin
<b>FCS:</b>	fötales Kälberserum, Biochrom, Berlin Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren für 30 min. auf 56°C erhitzt
<b>PBS:</b>	Phosphate Buffered Saline 140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 14,7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>TEP:</b>	3 ml Trypsin (2,5 %ig) und 125 µl EDTA pH 7,5 in 100 ml PBS
<b>Differenzierungsmedium:</b>	DMEM mit 10% FCS, 1x Pen/Strep, 1x Glutamin, 50 µg/ml Ascorbat und 10 mM β-Glycerolphosphat
<b>Puromycin:</b>	2,5 mg/ml Stocklösung
<b>G418:</b>	100 mg/ml Stocklösung

### 5.4.3 Kulturbedingungen

Die adhärent wachsenden C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen werden in Roux-Flaschen (Rx-Flaschen), Petrischalen oder Mehrlochplatten mit supplementiertem DMEM-Medium bei 5% CO<sub>2</sub> und 37°C kultiviert.

### 5.4.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

#### 5.4.4.1 Auftauen von C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen

Die Zellen werden im flüssigen Stickstoff gelagert und zum Auftauen entnommen; das Auftauen sollte zügig geschehen, indem die Zellen bereits in der Hand vorgewärmt werden, um im 37°C Wasserbad aufzutauen. Die aufgetauten Zellen werden mit 13 ml Vollmedium versehen und in eine mittlere Zellkulturflasche gegeben.

Am folgenden Tag erfolgt ein Medienwechsel, um Reste des Einfriermediums (5 % DMSO in FCS) zu entfernen.

#### 5.4.4.2 Einfrieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung von Zellen werden diese in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die einzufrierende Kultur wird zunächst abtrypsinisiert (Kapitel 5.4.5), so daß die Zellsuspension in geeignete Röhrchen überführt und durch Zentrifugation bei RT, 500 g für 5 Minuten pelletiert werden kann. Der Überstand wird vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgesaugt, um das Zellpellet in 4 ml FCS/5% DMSO aufnehmen zu können. Die Zellsuspension wird in Aliquots á 1 ml in Kryo-Ampullen überführt und über Nacht bei -70°C gelagert. Am folgenden Tag werden die Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

### 5.4.5 Passagieren von Zellen

Nachdem das Kulturmedium sorgfältig abgesaugt wurde, werden die Zellen gründlich mit warmem PBS gespült. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Nach einigen Minuten löst sich der Zellrasen vom Boden der Kulturflasche ab. Zur Inaktivierung des Trypsins wird zur Zellsuspension mindestens die doppelte Menge an vorgewärmtem Kulturmedium hinzugegeben und die Zellen mittels einer Glaspipette dissoziiert.

Mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt, so daß die gewünschte Zellzahl in einem neuen Kulturgefäß ausgesät werden kann.

### 5.4.6 Stabile Transfektion von DNA in eukaryotische Zellen

Zum Einbringen von Fremd-DNA in C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen wurden zwei Transfektionsmethoden mit dem Ziel eingesetzt, eine stabile Integration in das Wirtsgenom zu erlangen. Durch Verwendung entsprechender Selektionssysteme kann eine beliebige Fremd-DNA in der chromosomalen DNA der Wirtszelle etabliert werden, wobei die Fremd-DNA und die kointegrierte Selektions-DNA an einer beliebigen Stelle des Wirtsgenoms rekombinieren.

24 Stunden vor der Transfektion wird mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer die Zellzahl der zu transfizierenden Zellen bestimmt und pro kleine Roux-Flasche  $5 \cdot 10^4$  Zellen in 5 ml Medium respektive pro Well einer 24-Loch-Mikrotiterplatte  $5 \cdot 10^3$  Zellen in 1 ml Medium ausgesät, um über Nacht unter Standardkulturbedingungen kultiviert zu werden. Zwei Stunden vor der eigentlichen Transfektion wird ein Medienwechsel vorgenommen.

#### 5.4.6.1 Transfektion mittels Kalziumphosphatpräzipitation

[Wigler, 1977]

Das Volumen des Präzipitats beträgt 800  $\mu$ l. 750  $\mu$ l HEBS-Puffer (0,818% NaCl (w/v); 0,595% Hepes (w/v); 0,02%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (w/v); pH 7,05) werden mit 4,0  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA und 4,0  $\mu$ g Carrier-DNA (hochmolekulare Plazenta-DNA; optional) versetzt. Sollte die Selektions-DNA kotransfiziert werden, so sind zu der HEBS-DNA-Lösung 400 ng Selektions-DNA (Neomycin- oder Puromycin-Resistenz) hinzuzufügen. Mit Hilfe einer Pasteurpipette und einer Pipettierhilfe werden in der HEBS-DNA-Lösung Luftblasen erzeugt, die für eine Durchmischung der Komponenten sorgen. Unter diesem „Blubbern“ werden zur HEBS-DNA-Lösung 50  $\mu$ l einer 2 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung tropfenweise hinzugegeben, so daß sich ein feiner weißer Niederschlag ausbildet. Das Präzipitat wird für mindestens 1 h bei RT inkubiert, um schließlich tropfenweise in das Kulturmedium der zu transfizierenden Zellen gegeben zu werden. Die Zellen werden über Nacht kultiviert; alternativ können die Zellen nach 4 stündiger Inkubation mit dem Präzipitat einem Glycerolschock unterzogen werden, indem das Präzipitat abgesaugt wird und die Zellen für 30 Sekunden mit 2 ml HEBS/15% Glycerol überschichtet werden. Das HEBS/Glycerol wird abgesaugt und die Zellen unter Vollmedium kultiviert.

24 Stunden nach der Transfektion werden die Zellen in eine mittlere Roux-Flasche umgesetzt, um nach weiteren 24 Stunden dem Selektionsmedium (DMEM, 10% FCS, 500  $\mu$ g/ml G418 und/oder 2,5  $\mu$ g/ml Puromycin) ausgesetzt zu werden. Das Selektionsmedium wird alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach zwei bis drei Wochen bilden sich die ersten Zellklone aus.

In den nächsten zwei Wochen wird der Selektionsdruck sukzessive erhöht (750  $\mu$ g/ml G418/4,0  $\mu$ g/ml Puromycin). Ist die Selektion abgeschlossen, das heißt, daß die Plasmid-DNA stabil in der chromosomalen DNA etabliert ist, werden die transfizierten Zellen zur weiteren Kultur mit Selektionsmedium (500  $\mu$ g/ml G418 / 2,5  $\mu$ g/ml Puromycin) kultiviert.

#### 5.4.6.2 Transfektion mittels Liposom-DNA-Komplexe

Der Mechanismus der Transfektion mit Hilfe von Liposom-DNA-Komplexen basiert auf der unspezifischen Bindung polykationischer Lipid-DNA-Komplexe an die negativ geladene Zelloberfläche mit anschließender Aufnahme der Fremd-DNA durch die Zelle.

Zur Transfektion mittels Lipofektion werden die Zellen in 24-Loch-Mikrotiterplatten kultiviert. Analog zur Kalziumphosphatpräzipitation wird zwei Stunden vor der Transfektion ein Medienwechsel vorgenommen. Zur Herstellung der Transfektionslösung werden pro Well der 24-Loch-Mikrotiterplatte 0,5  $\mu$ g der zu transfizierenden DNA und 50 ng des Selektionsplasmids (pBSpac $\Delta$ p, de la Luna, 1988) gemischt und mit HBS-Puffer (20 mM Hepes; 150 mM NaCl; pH 7,4) auf ein Endvolumen von 25  $\mu$ l aufgefüllt. Desweiteren werden 4  $\mu$ l des Lipids (Dospers/1,3-Di-Oleoyloxy-2-(6-Carboxy-spermyl)-propylamid/ $\text{C}_{58}\text{H}_{113}\text{O}_{13}\text{N}_5$  nach Boehringer Mannheim; Kat.Nr.: 1781995) mit HBS-Puffer auf ein Endvolumen von 25  $\mu$ l aufgefüllt. Die Lösungen werden vereinigt, gemischt und für 15 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Medium durch 500  $\mu$ l Medium ohne FCS ersetzt.

Zur Lipofektion werden 30 µl der Transfektionslösung tropfenweise in das Kulturmedium gegeben. Nach 6 stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wird das Kulturmedium durch Zugabe von 500 µl Medium mit 20% FCS komplettiert. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgt ein Medienwechsel, so daß 48 Stunden nach der Transfektion mit der Selektion begonnen werden kann (Medium mit FCS und 2,5 µg/ml Puromycin). Nach zirka einer Woche bilden sich die ersten Zellklone aus, so daß der Selektionsdruck sukzessive auf 4,0 µg/ml Puromycin erhöht werden kann.

Nach weiteren ein bis zwei Wochen ist die Selektion abgeschlossen, die Zellen können durch Passage in 6-Loch-Platten oder kleine Rx-Flaschen verbreitert werden. Die weitere Kultur der stabil transfizierten Zellen erfolgt mit Puromycin-haltigem Medium (2,5 µg/ml).

#### **5.4.7 Histologische Färbetechniken**

[Ahrens, 1995]

##### **5.4.7.1 Fixierung der zu färbenden Zellen**

Zum Fixieren der Zellen wird das Kulturmedium vollständig abgesaugt. Der Zellrasen wird mit warmem PBS gewaschen und anschließend mit Methanol (-20°C) oder auch Ethanol (-20°C) bedeckt. Die zu fixierenden Zellen werden für mindestens 15 Minuten bei -20°C inkubiert, um anschließend die Fixierlösung abzusaugen und die fixierten Zellen mit sterilem Wasser zu waschen. Die Zellen werden bis zur Färbung mit sterilem Wasser überschichtet und können bei 4°C gelagert werden.

##### **5.4.7.2 Alcian Blau Färbung (Chondrozytenfärbung)**

Die mit Methanol fixierten Zellen werden, nachdem sie erneut mit sterilem Wasser gespült wurden, mit einer Alcian Blue 8GS Färbelösung (0,5 % in 1 N HCl; Roth, Kat.Nr.: 3082.1) bedeckt und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Durch Alcian Blau, pH 2,5 wird die Knorpelgrundsubstanz -saures, sulfatreiches Proteoglycan- spezifisch angefärbt. Nach der Färbung wird die Färbelösung abgesaugt, die Zellen mit sterilem Wasser gewaschen und mit Wasser überschichtet.

Im Lichtmikroskop erscheint das gefärbte Proteoglycan blau, während die übrigen Zellbestandteile hell erscheinen.

##### **5.4.7.3 Oil Red O Färbung (Adipozytenfärbung)**

Die mit Ethanol fixierten Zellen werden mit sterilem Wasser gewaschen und für eine Minute mit 50 %igem Ethanol bedeckt. Anschließend wird das Ethanol abgesaugt und die Zellen für 10 Minuten mit einer Sudan III - Lösung (1 g/l in 70%igem Ethanol) überschichtet. Nach der Inkubation werden die Zellen mit 70%igem Ethanol gewaschen und mit TE überschichtet. Hierbei reichert sich Sudan III spezifisch in den neutralen Fetttröpfchen der Adipozyten an und erscheint im Lichtmikroskop rot-gelb. Diese Färbung bleibt nur über einen kurzen Zeitraum stabil.

#### 5.4.7.4 Alkalische Phosphatase Färbung (Osteoblasten- und Chondrozytenfärbung)

Die mit Methanol fixierten Zellen werden mit sterilem Wasser gewaschen und zwei mal für jeweils 10 Minuten mit Puffer P1 (100mM Tris/HCl; 150mM NaCl; pH 7,5) gespült. Zur Äquilibration werden die Zellen für 2 Minuten mit dem Puffer P3 (100mM Tris/HCl; 100mM NaCl; 50mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9,5) überschichtet. Zum Nachweis der zellulären Alkalischen Phosphatase wird der Zellrasen für 15 Minuten mit der Färbelösung (NBT/BCIP-Stocklösung; 67% in DMSO (v/v); Boehringer Mannheim; Kat.Nr.: 1175041; 20µl/ml in P3) inkubiert. Zelluläre Alkalische Phosphatase katalysiert eine Farbreaktion mit Nitroblue-Tetrazolsalz (NBT) und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP), so daß ein unlöslicher braun-schwarzer Niederschlag entsteht, der visuell wahrgenommen werden kann und die Aktivität zellulärer Alkalischer Phosphatase nachweist.

#### 5.4.7.5 von Kossa Färbung (Nachweis der Mineralisierung)

Die mit Methanol fixierten Zellen werden mit sterilem Wasser gewaschen und für 30 min. unter Lichtabschluß mit Silbernitratlösung (5% AgNO<sub>3</sub> in H<sub>2</sub>O) inkubiert. Die Zellen werden gründlich mit sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und mit einer Reduktionslösung (5g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 µl Formaldehyd (37%ig) in 100 ml H<sub>2</sub>O) bedeckt. Die Reduktionsreaktion erfolgt innerhalb weniger Minuten und wird durch erneutes Waschen mit H<sub>2</sub>O gestoppt. Kalziumablagerungen in Mineralisierungszonen färben sich durch die Reaktion mit Silber bräunlich-schwarz.

#### 5.4.7.6 Kernfärbung mit Hämatoxylin

[Mayer, 1891]

Hämatoxylin oder auch Hämalaunlacke zeigen aufgrund ihrer positiven Ladung vorerst Affinität zu negativ geladenen Gewebekomponenten und eignen sich daher zur schnellen Anfärbung von Zellkernen in der Zyto- und Histologie.

Die mit Methanol fixierten Zellen werden mit Wasser gespült und für 10 Minuten in Hämatoxylin-Lösung (2,5g Hämatoxylin (Merck, Kat.Nr.: 115938), 0,5g Natriumiodat und 125g Kaliumaluminiumsulfat-dodecahydrat, 125g Chloralhydrat, 2,5g Zitronensäure in 2,5 l H<sub>2</sub>O lösen und für 4 Wochen bei RT „reifen“ lassen; vor Gebrauch filtrieren) inkubiert, um anschließend kurz unter fließendem Wasser abgespült zu werden. Das Bläuen der Kerne erfolgt in warmem Wasser für weitere 10 Minuten.

#### 5.4.7.7 X-Gal Färbung zum Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase

Zum Nachweis der Expression von  $\beta$ -Galaktosidase werden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen werden 2x mit eiskaltem PBS/2%FCS gewaschen und für 20 min. bei RT mit eiskaltem 3% Paraformaldehyd inkubiert, um anschließend 2x mit eiskaltem PBS gewaschen zu werden. Der Zellaufschluß erfolgt für 5 min. bei RT mit Methanol/Aceton (1:1; -20°C). Nach Entfernung des Methanol/Aceton-Gemisches wird der Zellrasen für 10 min. bei RT getrocknet, um 2x mit eiskaltem PBS gewaschen zu werden. Zur Lagerung werden die fixierten Zellen mit PBS überschichtet und bei 4°C aufbewahrt.

Zur Darstellung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität werden die Zellen mit Färbelösung (5mM  $K_3Fe(III)(CN)_6$ , 5 mM  $K_3Fe(II)(CN)_6$ , 2 mM  $MgCl_2$ , 100  $\mu g/ml$  X-Gal in DMF/PBS) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Abschluß der Färbung werden die Zellen 3x mit sterilem  $H_2O$  gewaschen und können bei 4°C gelagert werden.

Der Nachweis der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist lichtmikroskopisch als türkis-blaue Färbung dargestellt.

#### 5.4.7.8 Nachweis zur Expression von GFP

GFP (*Green Fluorescent Protein*) dient seit seiner Klonierung [Prasher, 1992; Inouye, 1994] aus dem Eismeerfisch *Aequorea victoria* aufgrund seiner fluoreszierenden Eigenschaften und erfolgreichen Expression in heterologen Systemen [Chalfie, 1994; Wang, 1994] als neueres genetisches Reportersystem. Das GFP-Chromophor besteht aus einem zyklischen Tripeptid (Ser-Tyr-Gly), welches eingebettet im Gesamtprotein seine fluoreszierenden Eigenschaften entwickelt [Cody, 1993]. Wildtyp-GFP absorbiert blaues und UV-Licht bei einem Maximum von 395 nm und reduziert bei 470nm. Grünes Licht wird bei einem Maximum von 509 nm und 540 nm emittiert [Ward, 1980].

Zum Nachweis der GFP-Aktivität werden die Zellen auf Objektträgern oder in Chamber-Slides kultiviert. Die Zellen werden 2x mit vorgewärmten PBS gewaschen und mit einem Deckgläschen versehen; alternativ können die Zellen für 15 min. bei RT mit Formaldehyd/ Glutaraldehyd (9,38 ml PBS, 540  $\mu l$  Formaldehyd (37%, v/v) und 80  $\mu l$  Glutaraldehyd (25%, v/v)) fixiert werden.

Der Nachweis der GFP-Expression erfolgt mittels der Fluoreszenzmikroskopie, wobei hier ein FITC (Fluorescein Isothiocyanat) Filter-Satz verwendet wird.

#### 5.4.8 Isolierung primärer Chondrozyten aus Knorpelgeweben

Die Knorpelbiopsien werden mit 70% Ethanol gespült, mit einem Skalpell zerkleinert, in vorgewärmtes RPMI 1640 Medium (Biochrom, Berlin; Pen/Strep, 2 mM Glutamin) überführt und erneut mit 70% Ethanol gespült. Die Knorpelstücke werden mit 30 ml steril filtriertem Enzymmix (0,15 mg/ml DNase I, 2 mg/ml Kollagenase P (Boehringer, Kat.Nr.: 1213857), 2 mg/ml Kollagenase Typ CLS II (Seromed, Kat.Nr.: C2-22), 0,1 mg/ml Hyaluronidase (Sigma, Kat.Nr.: H4272) in RPMI 1640 (Pen/Strep, 2 mM Glutamin, 10% FCS)) versetzt und in eine Spinnerflasche überführt. Der enzymatische Verdau erfolgt für 2 bis 4 Stunden unter Rühren bei 37°C und 5%  $CO_2$ ; für die Gewinnung von Chondrozyten für die Zellkultivierung wird der Verdau über Nacht durchgeführt.

Die resultierende Zellsuspension wird mittels eines sterilen Netzfilters (Falcon, Kat.Nr.: 2360) filtriert und für 5 min. bei 600 g zentrifugiert. Das Zellpellet ist in Hank's-Puffer zu resuspendieren und erneut bei 600 g für 5 min. zu zentrifugieren; dieser Waschschrift wird wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation klar erscheint.

Zur Isolierung von Gesamt-RNA werden 1-4 mio. Zellen pelletiert und in 1 ml Tri-Reagent aufgenommen, um die Gesamt-RNA aufzuarbeiten (Kapitel 5.5.1). Zur weiteren Kultivierung der isolierten Chondrozyten wird das Zellpellet in RPMI 1640 (Pen/Strep, 2 mM Glutamin, 10% FCS) resuspendiert und in einer Zelldicht von circa 80000 Zellen/ $cm^2$  ausgesät. Nach dem Adhären der Zellen erfolgt der erste Medienwechsel.

## 5.5 Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 5.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zellen wird das Tri Reagent LS eingesetzt (Molecular Research Center, Inc.; Kat.Nr.: TS-120), welches auf der „*Single Step RNA-Isolation*“-Methode basiert [Chomczynski, 1987/1993].

Die Zellen werden in geeigneten Kulturgefäßen bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wird abgesaugt. Zur Lyse der Zellen werden pro 10 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche des Kulturgefäßes 0,4 ml Tri Reagent LS auf die Zellen gegeben. Mit einer Pipette werden die adhären wachsenden Zellen abgespült, dissoziiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wird für 5 min. bei RT inkubiert, um eine Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu ermöglichen. Zur Trennung der RNA von Proteinen und DNA wird das Lysat mit 0,1 ml BCP pro 0,75 ml Tri Reagent LS versetzt, für 15 Sekunden geschüttelt und für 10 min. bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 12000 g führt zur Phasentrennung. Die wässrige Phase ist in 200 µl Aliquots abzunehmen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zu überführen.

Hierbei ist zu beachten, daß Proteine und genomische DNA in der organischen respektive Interphase verbleiben, so daß diese zur Extraktion von DNA und Proteinen eingesetzt werden können; die Lagerung erfolgt bei 4°C.

Um die RNA zu fällen, wird die Lösung mit 0,5 ml Isopropanol pro 0,75 ml Tri Reagent LS versetzt und für 7 Minuten bei -20°C belassen. Die gefällte RNA wird durch Zentrifugation für 8 Minuten bei 4°C und 12000 g pelletiert. Das resultierende RNA-Pellet ist mit 70% EtOH zu waschen, an der Luft zu trocknen und in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufzunehmen. Zur Lösung des Pellets wird es für 10 Minuten auf 55°C erhitzt. Der Gehalt an isolierter Gesamt-RNA wird durch eine photometrische Messung bestimmt.

### 5.5.2 Isolierung von mRNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Aufreinigung von mRNA aus Gesamt-RNA wird das mRNA-Purification-Kit der Firma Pharmacia (Kat.Nr.: 27-9258-01) verwendet. Nach Isolierung der Gesamt-RNA werden 85 µg RNA mit TE (10/1 in DEPC) auf ein Endvolumen von 1000 µl eingestellt, für 5 min. bei 65°C inkubiert und auf Eis mit 200 µl Probenpuffer (1 mM EDTA; 3,0 M NaCl; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4) versetzt. Die Oligo(dT)-Zellulose-Säule ist 2x mit jeweils 1 ml Hochsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,5 M NaCl) zu äquilibrieren. Nach dem Äquilibrieren der Säule wird die RNA-Probe auf die Säule gegeben und für 2 min. bei RT und 350 g zentrifugiert. Die Säule wird mit 2,5 ml Hochsalzpuffer versetzt und erneut für 2 min. bei RT und 350 g zentrifugiert, um anschließend 3x mit 500 µl Niedrigsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 0,1 M NaCl) durch Zentrifugation für 2 min. bei 350 g gewaschen zu werden. Zur Elution werden sequentiell 4x 250 µl auf 65°C erwärmter Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA) auf die Säule gegeben. Das Eluat wird mit 100 µl Probenpuffer, 10 µl Glykogen (10 mg/ml) und 2,5 ml eiskaltem Ethanol (-20°C) versetzt, für 2 Stunden bei -20°C gefällt und bei 4°C und 13000 g für 30 min. zentrifugiert. Das Pellet wird in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und wird direkt für die cDNA-Synthese (Kapitel 5.5.4) eingesetzt.

### 5.5.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA erfolgt nach der modifizierten Methode von Gubler und Hoffmann, 1983 mit dem cDNA-Synthese-System der Firma GIBCO BRL.

Der Anteil der mRNA an der gesamten zellulären RNA beträgt circa 1-2 %; selektiv wird mRNA durch den Einsatz von Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primern revers zu cDNA transkribiert. Die Oligo-(dT)<sub>12-18</sub>-Primer binden an das 3'-polyA-Ende der mRNA, so daß komplementär zur mRNA mittels M-MLV Reverser Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase) einzelsträngige cDNA synthetisiert wird.

Zur cDNA-Synthese werden 5 µg Gesamt-RNA in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O eingesetzt und mit 1 µl Oligo-(dT)<sub>12-18</sub> (0,5 µg/µl; GIBCO, Kat.Nr.: 18418-012) versetzt, um für 10 min. bei 70°C denaturiert zu werden. Nach der Denaturierung wird der Reaktionsansatz auf Eis gelagert und mit 4 µl 5x Puffer (0,25 M Tris/HCl, pH 8,3; 0,375 M KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP (je 10 mM) und 0,4 µl RNase Inhibitor (16 U, Promega, Kat.Nr.: N2511) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 2 min. bei 37°C wird der Reaktionsansatz mit 1 µl SuperScript Reverse Transkriptase (GIBCO, Kat.Nr.: 18053-017) versehen, um für weitere 60 Minuten bei 37°C inkubiert zu werden. Nach der Zugabe von 40 µl TE (10/1, pH 7,8) wird das Enzym für 10 min. bei 92°C inaktiviert. Für die RT-PCR Reaktionen werden 0,01-5,0 µl cDNA eingesetzt.

## 5.6 Rezeptor-Bindungsstudien mittels rekombinanter Proteine

### 5.6.1 Iodierung rekombinanter Proteine

Für die Bindungsstudien rekombinant exprimierter BMP Typ I Rezeptoren wurde rekombinantes humanes BMP-2 verwendet. Zur Iodierung werden 4 µg Protein mit 0,05 M Phosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) auf ein Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die Proteinlösung wird mit 250 µCi Iod<sup>125</sup> und 20 µl Chloramin T (1 mg/ml in PBS) versetzt, um nach einer Reaktionszeit von 90 sek. mit 20 µl Natrium-Metabisulfit (1 mg/ml in PBS) gestoppt zu werden. Zur Gelfiltration wird, nach dem Auffüllen der Proteinlösung mit PBS (1 mg/ml BSA) auf ein Endvolumen von 2,5 ml, eine PD 10 Säule verwendet. Die Elution erfolgt 3x mit 1 ml PBS und 1x mit 0,5 ml PBS (je 1 mg/ml BSA). Ein Aliquot von 5 µl der jeweiligen Fraktion wird im Szintillationszähler auf Aktivität vermessen. Desweiteren werden Aliquots der aktiven Fraktionen mit TCA zur Vermessung des präzipitierten Proteins gefällt. Hierfür werden 2 µl des Eluats mit 20 µl FCS und 1 ml Trichloracetat (TCA) versetzt und für 15 min. auf Eis inkubiert. Die Fällung erfolgt durch Zentrifugation für 5 min. bei 4°C und 5000 g. Die Proteinpellets sind in PBS (1 mg/ml BSA) aufzunehmen und im Szintillationszähler zu vermessen. Die Fraktionen mit radioaktiv markiertem Protein sind zu vereinigen und werden bei -20°C gelagert.

### 5.6.2 Rezeptor-Bindungsstudie

Zur Bindung von radioaktiv markiertem BMP-2 werden die jeweiligen C3H10T $\frac{1}{2}$ -Zellen in einer Zelldichte von 11000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 24-Loch Mehrlochplatten ausgesät und unter Standardbedingungen kultiviert. Nach Erreichen zellulärer Konfluenz wird das Kulturmedium mit Ascorbat (50 µg/ml) und  $\beta$ -Glycerophosphat (10 mM) substituiert; die Bindungstests wurden 2 Tage nach Erreichen zellulärer Konfluenz durchgeführt.



Der Bindungstest ist auf Eis durchzuführen. Die Zellen werden 3x mit jeweils 1 ml eiskaltem Bindepuffer (DME, 30 mM Hepes, 1 mg/ml BSA) gewaschen und anschließend mit 250 µl Bindepuffer überschichtet. Das markierte Protein wird in den entsprechenden Verdünnungen mit Bindepuffer auf ein Endvolumen von 250 µl eingestellt und auf die Zellen gegeben. Die Bindung erfolgt für 2,5 Stunden auf Eis unter leichtem Schütteln. Zur Entfernung ungebundenen Proteins werden die Zellen 3x mit jeweils 1 ml eiskaltem Bindepuffer gewaschen, um mit 500 µl Lysispuffer (0,3 M NaOH, 0,1% SDS) versetzt zu werden. Die Lyse der Zellen erfolgt für 10 min. bei RT. Die Zelllysate werden in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und für 60 sek. im Szintillationszähler vermessen.

## **5.7 Immunologischer Nachweis rekombinanter Expression in eukaryotischen Zellen**

### **5.7.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus eukaryotischen Zellen**

Zur Isolierung des Gesamt-Proteins aus eukaryotischen Zellen wird das Tri Reagent LS (Molecular Research Center, Inc.; Kat.Nr.: TS-120) eingesetzt.

Nach Kultivierung der Zellen wird der Zellrasen nach dem Absaugen des Kulturmediums zur Lyse mit 0,4 ml Tri Reagent LS pro 10 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche überschichtet. Mit einer Pipette werden die adhärent wachsenden Zellen abgespült, dissoziiert und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wird für 5 min. bei RT inkubiert, um eine Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu ermöglichen. Zur Trennung der RNA von Proteinen und DNA wird das Lysat mit 0,1 ml BCP pro 0,75 ml Tri Reagent LS versetzt, für 15 sek. geschüttelt und für 10 min. bei RT inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 15 min. bei 4°C und 12000 g führt zur Phasentrennung. Die wässrige Phase wird abgenommen und kann zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet werden (Kapitel 5.2.1). Die organische Phase wird mit 0,3 ml EtOH pro 0,75 ml Tri Reagent LS versetzt, durch Schwenken gemischt und 3 min. bei RT inkubiert. Zum Pelletieren der genomischen DNA erfolgt eine Zentrifugation bei 4°C und 2000 g für 5 min. Der Überstand wird abgenommen und in 0,4 ml Aliquots auf 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt. Zur Fällung der Proteine wird der Überstand mit 0,75 ml Isopropanol versetzt und für 10 min. bei RT inkubiert. Die Proteine werden durch Zentrifugation bei 4°C mit 7500g für 10 min. pelletiert. Das resultierende Proteinpellet wird 3x mit Guanidinium-Hydrochlorid (0,3M Guanidinium-Hydrochlorid in 95% EtOH) gewaschen, indem das Pellet mit 1 ml Guanidinium-Hydrochlorid versetzt, 20 min. bei RT inkubiert und 5 min. bei 4°C und 7500g zentrifugiert wird. Nach dem Waschen mit Guanidinium-Hydrochlorid erfolgt ein weiterer Waschschrift mit 1 ml EtOH.

Das Proteinpellet ist 5 min. bei RT zu trocknen und wird in reduzierendem Harnstoffpuffer (4,2042 g Urea, 645 µl upper gel buffer (0,5 M Tris, pH 6,7-6,8, 0,4% SDS (w/v)), 4 ml 1% SDS in H<sub>2</sub>O, 320 µl 0,25 M EDTA, 1865 ml H<sub>2</sub>O, 0,1788 g DTT) resuspendiert.

### 5.7.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Coomassie Brilliant Blue

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford, 1976, werden die zu vermessenden Proteinproben sowie die zur Ermittlung der Eichgeraden (Bereich von 0 µg/ml bis 200 µg/ml) verwendete BSA-Stammlösung (Pierce, Kat.Nr.: 38836T) in PBS verdünnt. 10 µl der verdünnten Probe wird mit 200 µl Farblösung (20 mg Coomassie Brilliant Blue G250; Sigma, Kat.Nr.: B5133, 11,7 ml EtOH und 26,95 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 250 ml einstellen, filtrieren und im Dunkeln bei 4°C lagern) versetzt, unter Schütteln für 5 min. bei RT inkubiert und bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 595$  nm vermessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt anhand der ermittelten BSA-Eichgerade.

### 5.7.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung des Proteinextraktes wird eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli, 1970, unter Verwendung des Minigel Twin Systems (Gelgröße: 8,6 x 7,7cm; Biometra, Kat.Nr.: 010-100) eingesetzt. Nach Zusammenbau der mit 1% SDS, H<sub>2</sub>O und EtOH gesäuberten Glasplatten des Minigel Twin Systems wird zunächst das 15%ige Trenngel (5 ml Acrylamid-Bisacrylamid 30/0,8 (Roth, Kat.Nr.: 3091.1), 2,5 ml lower gel buffer (1,5M Tris, 0,4% SDS, pH 8,8), 2,4 ml H<sub>2</sub>O, 8 µl TEMED, 12 µl APS (40% (w/v) APS in H<sub>2</sub>O)) bis 2 cm unterhalb des Gelkammerrandes eingefüllt und mit H<sub>2</sub>O überschichtet. Nach dem Aushärten des Trenngels wird das H<sub>2</sub>O dekantiert und mit dem Sammelgel (700 µl Acrylamid-Bisacrylamid (30/0,8), 2 ml upper gel buffer (0,5M Tris, 0,4% SDS, pH 6,7), 4,2 ml H<sub>2</sub>O, 10 µl TEMED, 16 µl APS (40% (w/v) APS in H<sub>2</sub>O)) überschichtet.

Nach Polymerisation wird das Gel in die Gelelektrophorese-Apparatur eingesetzt, welche mit 1x Laufpuffer (8x Laufpuffer: 1,85 ml Tris, 0,67M Glycin, 0,8% SDS, 16mM EDTA, pH 8,8) befüllt wird. Die aufzutrennenden Proteinproben werden mit Bromphenolblau versetzt und vor dem Auftragen für 2 min. bei 50°C denaturiert; der hier verwendete Größenstandard (Gibco BRL, Kat.Nr.: 16001-018) ist für 5 min. bei 95°C zu denaturieren. Zur Elektrophorese wird eine Spannung von 75 Volt angelegt bis die Bromphenolblau-Front das Trenngel erreicht; die weitere Auftrennung der Proteine im Trenngel erfolgt bei einer Spannung von 150 Volt.

### 5.7.4 Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie Brilliant Blue

Zur unspezifischen Anfärbung der in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wird Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma, Kat.Nr.: B7920) verwendet. Die SDS-Gele werden für 30 min. unter Schütteln in Coomassie Färbelösung (40 ml Eisessig, 200 ml 0,5% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250 in H<sub>2</sub>O) bei RT inkubiert. Das Entfärben und Darstellen der aufgetrennten Proteine erfolgt über Nacht unter Schütteln in Entfärbelösung (10% (v/v) Eisessig, 20% (v/v) Methanol in H<sub>2</sub>O).

### 5.7.5 Western-Blotting

Zum Transfer der im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen (HAHY/0,45  $\mu\text{m}$ , Millipore, Kat.Nr.: 00010) wird das semi-dry Fastblot-System der Firma Biometra (Kat.Nr.: 014-800) verwendet. Es werden drei Lagen zugeschnittenes Whatman 3MM Papier, welche mit Transferpuffer (300 ml 10x Transferpuffer (0,25M Tris, 1,92M Glycin), 600 ml Methanol, 2,1 l  $\text{H}_2\text{O}$ ) befeuchtet werden, auf der Anode plaziert. Die zugeschnittene Nitrozellulosemembran wird ebenfalls mit Transferpuffer befeuchtet und auf das Whatman 3MM Papier aufgelegt. Es folgt das Polyacrylamidgel und abschließend drei Lagen durchfeuchtetes Whatman 3MM Papier. Nach Aufsetzen der Kathode werden die Proteine für 2 h bei 0,7  $\text{mA}/\text{cm}^2$  auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Nach dem Transfer wird die Membran 2x für 5 min. in TBS (10x TBS: 0,8% NaCl, 0,02% KCl, 50mM Tris-HCl, pH 7,4) geschwenkt.

Für den immunologischen Nachweis (hier: Flag-Epitop-BMPRI-Fusionsproteine, Flag-Tag) und Detektion wird das BM Chemiluminescence Blotting Substrate (Boehringer Mannheim, Kat.Nr.: 1500708) eingesetzt. Dieses Detektionssystem basiert auf der Oxidation von Luminol in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Peroxidase; das aktivierte Intermediärprodukt dieser Reaktion fällt unter Emission von Licht auf seinen energetischen Grundzustand zurück, so daß das Signal durch Schwärzung des Röntgenfilms nach Exposition detektiert werden kann. Zur Detektion der Flag-Tag-BMPRI wird die Nitrozellulosemembran für 1 h unter Schütteln mit 1%iger Blocking Solution in TBS bei RT inkubiert. Der Primärantikörper (hier: mouse anti-Flag M2, Sigma, Kat.Nr.: F3165) wird 1:1666 mit 0,5%iger Blocking Solution in TBS verdünnt und auf die Membran gegeben; die Inkubation erfolgt über Nacht unter Schütteln bei 4°C. Die Membran ist 3x für 10 min. unter Schütteln mit 0,1% TTBS (0,1% Tween 20 in TBS) bei RT zu waschen. Als Zweitantikörper dient ein goat-anti-mouse-IgG Antikörper, welcher Peroxidase gekoppelt ist (Dianova, Kat.Nr.: 115-035-003); der Zweitantikörper wird 1:5000 mit 0,5%iger Blocking Solution in TBS verdünnt und für 2 h unter Schütteln bei RT auf der Membran belassen. Die Membran wird 4x für 10 min. unter Schütteln mit 0,1% TTBS bei RT gewaschen und danach auf eine Plastikfolie plaziert, so daß 1,5 ml der Substratlösung aufgegeben werden können. Das Substrat wird für 1 min. im Hellen auf der Membran belassen, das Auflegen des Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR, Kat.Nr.: 1651496) und die Exposition für 1 min., 5 min. und 60 min. wird im Dunkeln durchgeführt. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgt maschinell mit dem Entwickler CURIX 60 der Firma AGFA.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahrens, M. et al** Expression of bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages; DNA and Cell Biology 12, 871-880, 1993
- Ahrens, M.** Isolierung und Charakterisierung von Bone Morphogenetic Protein (BMP)-regulierten Genen aus mesenchymalen Vorläuferzellen; Dissertation, 1995, TU Braunschweig
- Akiyama, S. et al** Constitutively active BMP type I receptors transduce BMP-2 signals without the ligand in C2C12 myoblasts; Exp. Cell Res. 235, 362-369, 1997
- Amaya, E. et al** Expression of a dominant negative mutant of the FGF receptor disrupts mesoderm formation in *Xenopus* embryos; Cell 66, 257-270, 1991
- Attisano, L. et al** Novel Activin Receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors; Cell 68, 97-108, 1992
- Attisano, L. et al** Identification of human activin and TGF- $\beta$  type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors; Cell 75, 671-680, 1993
- Attisano, L. et al** Activation of signaling by the activin receptor complex; Mol. Cell. Biol. 16, 1066-1073, 1996a
- Attisano, L. et al** Signal transduction by members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily; Cytokine&Growth Factor Reviews 7, 327-339, 1996b
- Bächner, D. et al** BMP-2 downstream targets in mesenchymal development identified by subtractive cloning from recombinant mesenchymal progenitors (C3H10T $\frac{1}{2}$ ); Dev. Dyn. 213, 398-411, 1998
- Baker, J.C. et al** From receptor to nucleus: the Smad pathway; Current Opinion in Genetics & Development 7, 467-473, 1997
- Basilico, C.; Moscatelli, D.** The FGF family of growth factors and oncogenes; Adv. Canc. Res. 59, 115-165, 1992
- Beck, L. et al** Pex/PEX tissue distribution and evidence for a deletion in the 3' region of the Pex gene in X-linked hypophosphatemic mice; J. Clin. Invest. 99, 1200-1209, 1997
- Bennet, J.H. et al** Adipocytic cells cultured from bone marrow have osteogenic potential; J. Cell Sci. 99, 131-139, 1991
- Birnboim, H.C.; Doly, J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523, 1979
- Bradford, M.M.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding; Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976
- Burt, D.W. et al** Evolutionary origins of the Transforming Growth Factor- $\beta$  gene family; DNA Cell Biol. 11, 497-510, 1992
- Cancedda, R. et al** Chondrocyte differentiation; International Review of Cytology 159, 265-358, 1995
- Carlson, C.S. et al** Immunolocalization of noncollagenous bone matrix proteins in lumbar vertebrae from intact and surgically menopausal cynomolgus monkeys; J. Bone and Mineral Res. 8, 71-81, 1993
- Celeste, A.J. et al** Identification of Transforming Growth Factor- $\beta$  family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone; PNAS 87, 9843-9847, 1990
- Chalaux, E. et al** JunB is involved in the inhibition of myogenic differentiation by Bone Morphogenetic Protein-2; J. Biol. Chem. 273, 537-543, 1998

- Chalfie, M. et al** Green fluorescent protein as a marker for gene expression; *Science* 263, 802-805, 1994
- Chandrasekhar, S. et al** Osteonectin/SPARC is a product of articular chondrocytes / cartilage and is regulated by cytokines and growth factors; *Biochim. Biophys. Acta* 1221, 7-14, 1994
- Chang, S.C. et al** Cartilage-derived Morphogenetic Proteins; *J. Biol. Chem.* 269, 28227-28234, 1994
- Chen, D. et al** Differential roles for Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor IB and IA in differentiation and specification of mesenchymal precursor cells to osteoblast and adipocyte lineages; *J. Cell Biol.* 142, 295-305, 1998
- Chen, F. et al** Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth-factor- $\beta$  receptor kinases; *PNAS* 92, 1565-1569, 1995
- Chen, T.L. et al** Bone Morphogenetic Protein-2B stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: comparison with TGF- $\beta$ 1; *J. Bone Mineral Res.* 6, 1387-1393, 1991
- Chomczynski, P. et al** Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction; *Anal. Biochem.* 162, 156-159, 1987
- Chomczynski, P. et al** A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples; *BioTechniques* 15, 532-537, 1993
- Cody, C.W. et al** Chemical structure of the hexapeptide chromophore of *Aequorea* green-fluorescent protein; *Biochemistry* 32, 1212-1218, 1993
- Colbère-Garapin, F. et al** A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells; *J.Mol.Biol.* 150, 1-14, 1981
- Colvin, J.S. et al** Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3; *Nat. Genet.* 12, 390-397, 1996
- Cornelius, P. et al** Regulation of lipoprotein lipase mRNA content in 3T3-L1 cells by tumour necrosis factor; *Biochem. J.* 249, 765-769, 1988
- Cornelius, P. et al** Regulation of adipocyte development; *Annu. Rev. Nutr.* 14, 99-129, 1994
- Current Protocols in Molecular Biology**, Ausubel, I; Frederick M., 1998, ISBN 0-471-50338-X
- Deng, C. et al** Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth; *Cell* 84, 911-921, 1996
- Denhardt, D.T.; Guo, X.** Osteopontin: A protein with diverse functions; *FASEB J.* 7, 1475-1482, 1993
- Denker, A.E. et al** Chondrogenic differentiation of murine C3H10T $\frac{1}{2}$  multipotential mesenchymal cells; *Differentiation* 64, 67-76, 1999
- Derynck, R.** TGF- $\beta$ -receptor-mediated signaling; *TIBS* 19, 548-553, 1994
- Derynck, R. et al** Nomenclature: Vertebrate mediators of TGF- $\beta$  family signals; *Cell* 87, 173, 1996
- Derynck, R. et al** TGF- $\beta$  receptor signaling; *Biochimica et Biophysica Acta* 133, F105-F150, 1997
- Derynck, R. et al** Smads: Transcriptional activators of TGF- $\beta$  responses; *Cell* 95, 737-740, 1998
- Dewulf, N. et al** Distinct spatial and temporal expression patterns of two type I receptors for Bone Morphogenetic Proteins during mouse embryogenesis; *Endocrinology* 136, 2652-2663, 1995
- Doapin, S. et al** Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily; *Science* 257, 369-373, 1992

- Du, L. et al** cDNA cloning of the murine Pex gene implicated in X-linked hypophosphatemia and evidence for expression in bone; *Genomics* 36, 22-28, 1996
- Ducy, P. et al** Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation; *Cell* 89, 747-754, 1997
- Dudley, A.T. et al** A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye; *Genes & Development* 9, 2795-2807, 1995
- Ebner, R. et al** Cloning of a type I TGF- $\beta$  receptor and its effect on TGF- $\beta$  binding to the type II receptor; *Science* 260, 1344-1348, 1993
- Ecarot, B. et al** Defective bone formation in Hyp mouse bone cells transplanted into normal mice: evidence in favor of an intrinsic osteoblast defect; *J. Bone Min. Res.* 7, 215-220, 1992
- Erlacher, L. et al** Cartilage-derived morphogenetic proteins and osteogenic protein-1 differentially regulate osteogenesis; *J. Bone Miner. Res.* 13, 383-392, 1998
- Erlebacher, A. et al** Toward a molecular understanding of skeletal development; *Cell* 80, 371-378, 1995
- Estevez, M. et al** The daf-4 gene encodes a bone morphogenetic protein receptor controlling *C. elegans* dauer larva development; *Nature*, 644-649, 1993
- Eyre, D.R. et al** Collagen type IX: evidence for covalent linkages to type II collagen in cartilage; *FEBS Lett.* 220, 337-341, 1987
- Ferguson, E.L. et al** Decapentaplegic acts as a morphogen to organize dorsal-ventral pattern in *Drosophila* embryo; *Cell* 71, 451-461, 1992
- Francis-West, P.H. et al** Mechanisms of GDF-5 action during skeletal development; *Development* 126, 1305-1315, 1999
- Franzén, P. et al** Cloning of TGF- $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF- $\beta$  type II receptor; *Cell* 75, 681-692, 1993
- Frisch, A. et al** XBMPRII, a novel *Xenopus* type II receptor mediating BMP signaling in embryonic tissues; *Development* 125, 431-442, 1998
- Frota-Ruchon, A.F. et al** Pex mRNA is localized in developing mouse osteoblasts and odontoblasts; *J. Histochem.&Cytochem.* 46, 459-468, 1998
- Fujii, M. et al** Roles of Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation; *Mol. Biol. Cell* 10, 3801-3813, 1999
- Gazit, D. et al** Modulation of expression and cell surface binding of members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily during retinoic acid-induced osteoblastic differentiation of multipotential mesenchymal cells; *Mol. Endocrinology* 7, 189-198, 1993
- Georgi, L.L. et al** *C. elegans* gene controlling dauer larva development, encodes a novel receptor protein kinase; *Cell* 61, 635-645, 1990
- Ghosh-Choudhury, N. et al** Immortalized murine osteoblasts derived from BMP2-T-antigen expressing transgenic mice; *Endocrinology* 137, 331-339, 1996
- Gimble, J.M. et al** Bone Morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells; *J. Cell. Biochem.* 58, 393-402, 1995
- Goldfarb, M.** Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development; *Cytokine&Growth Factor Reviews* 7, 311-325, 1996
- Graff, J.M. et al** Studies with a *Xenopus* BMP receptor suggest that ventral mesoderm-inducing signals override dorsal signals in vivo; *Cell* 79, 169-179, 1994

- Graff, J.M.** Embryonic patterning: To BMP or not to BMP, that is the question; *Cell* 89, 171-174, 1997
- Greener, A.** E.coli SURE<sup>TM</sup> Strain: clone 'uncloneable' DNA; *Stratagies* 3, 5-6, 1990
- Grieff, M. et al** Expression and cloning of the human X-linked hypophosphatemia gene cDNA; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 231, 635-639, 1997
- Griffith, D.L. et al** Three-dimensional structure of recombinant human osteogenic protein 1: Structural paradigm for the transforming growth factor  $\beta$  superfamily; *PNAS* 93, 878-883, 1996
- Gubler, U.; Hoffmann, B.J.** A simple and very efficient method for generating cDNA libraries; *Gene* 25, 263-269, 1983
- Hagg, R. et al** Absence of the  $\alpha 1(\text{IX})$  chain leads to a functional knock-out of the entire collagen IX protein in mice; *J. Biol. Chem.* 272, 20650-20654, 1997
- Harada, H. et al** Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation; *J. Biol. Chem.* 274, 6972-6978, 1999
- Harland, R.M.** The transforming growth factor- $\beta$  family and induction of the vertebrate mesoderm: Bone morphogenetic proteins are ventral inducers; *PNAS* 91, 10243-10246, 1994
- Hata, A. et al** Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4; *Nature* 388, 82-87, 1997
- Hauschka, P.V.** Osteocalcin: the vitamin K-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -binding protein of bone matrix; *Haemostasis* 16, 258-272, 1986
- Heldin, C.H. et al** TGF- $\beta$  signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins; *Nature* 390, 465-471, 1997
- Henderson, J.E. et al** Nucleolar localization of parathyroid hormone-related peptide enhances survival of chondrocytes under conditions that promote apoptotic cell death; *Mol. Cell Biol.* 15, 1064-1075, 1995
- Hiraki, Y. et al** Bone Morphogenetic Protein (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro; *J. Bone Mineral Res.* 6, 1373-1385, 1991
- Hogan, B.L.M. et al** Growth factors in development: the role of TGF- $\beta$  related polypeptide signaling molecules in embryogenesis; *Development Supplement*, 53-60, 1994
- Hogan, B.L.M.** Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development; *Genes&Development* 10, 1580-1594, 1996
- Hoodless, P.A. et al** MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways; *Cell* 85, 489-500, 1996
- Hoodless, P.A.; Wrana, J.L.** Mechanism and function of signaling by TGF- $\beta$  superfamily; *Protein molecules in signal transduction. Series: Current topics in microbiology and immunology* 228, 235-272, 1998
- Horton, W.A. et al** The chondrodysplasias; *Connective Tissue and its heritable Disorders*, P.M. Royce and B. Steinmanns, editors. Wiley-Liss, New York, 641-675, 1993
- Hötten, G.C. et al** Recombinant human growth/differentiation factor 5 stimulates mesenchyme aggregation and chondrogenesis responsible for the skeletal development of limbs; *Growth Factors* 13, 65-74, 1996
- Hu, E. et al** AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity; *J. Biol. Chem.* 271, 10697-10703, 1996
- Hudson, J.B. et al** The *Drosophila* Medea gene is required downstream of dpp and encodes a functional homolog of human Smad4; *Development* 125, 1407-1420, 1998

- Hunt, C.R. et al** Adipocyte P2 gene: Developmental expression and homology of 5'-flanking sequences among fat cell-specific genes; PNAS 83, 3786-3790, 1986
- HYP Consortium** A gene (Pex) with homologies to endopeptidases is mutated in patients with x-linked hypophosphatemic rickets; Nat. Genet. 11, 130-136, 1995
- Inouye, S. et al** *Aequorea victoria* green fluorescent protein: Expression of the gene and fluorescent characteristics of the recombinant protein; FEBS Letters 341, 277-280, 1994
- Ishidou, Y. et al** Enhanced expression of type I receptors for Bone Morphogenetic Proteins during bone formation; J. Bone Mineral Res. 10, 1651-1659, 1995
- Ito, Y.** Structural alterations in the transcription factors PEBP2/CBF linked to four different types of leukemia; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122, 266-274, 1996
- Jeffrey, J.J.; Martin, G.R.** The role of ascorbic acid in the biosynthesis of collagen; Biochim. Biophys. Acta 121, 269-280, 1966
- Ju, W.J.** The role of the signaling mediator Smad1 in BMP2-dependent osteo/chondrogenic development in mesenchymal progenitors (C3H10T $\frac{1}{2}$ ); Dissertation, 1999, TU Braunschweig
- Jüppner, H. et al** A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide; Science 254, 1024-1026, 1991
- Karaplis, A.C. et al** Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) gene; Genes & Development 8, 277-289, 1994
- Karaplis, A.C.; Deckelbaum, R.A.** Role of PTHrP and PTH-1 receptor in endochondral bone development; Frontiers in Bioscience 3, 795-803, 1998
- Katagiri, T. et al** Bone Morphogenetic Protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage; J. Cell Biol. 127, 1755-1766, 1994
- Katagiri, T. et al** Bone morphogenetic protein-2 inhibits terminal differentiation of myogenic cells by suppressing the transcriptional activity of MyoD and Myogenin; Exp. Cell Res. 230, 342-351, 1997
- Kawabata, M. et al** Signal transduction by bone morphogenetic proteins; Cytokine&Growth Factor Reviews 9, 49-61, 1998
- Kawakami, Y. et al** BMP signaling during bone pattern determination in the developing limb; Development 122, 3557-3566, 1996
- Kim J. et al** Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic; Nature 388, 304-308, 1997
- King, J.A. et al** BMP-5 and the molecular, skeletal, and soft-tissue alterations in short-ear mice; Dev. Biol. 166, 112-122, 1994
- Kingsley, D.M.** The TGF- $\beta$  superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms; Genes & Development 8, 133-146, 1994a
- Kingsley, D.M.** What do BMPs in mammals? Clues from the Mouse short ear mutation; Trends in Genetics 10, 16-21, 1994b
- Koenig, B.B. et al** Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH3T3 cells; Mol. Cell. Biol. 14, 5961-5974, 1994
- Komori, T. et al** Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts; Cell 89, 755-764, 1997
- Kosher, R.A. et al** Collagen gene expression during limb cartilage differentiation; J. Cell Biol. 102, 1151-1156, 1986



- Kretzmar, M. et al** SMADs: mediators and regulators of TGF- $\beta$  signaling; Current Opinion in Genetics and Development 8, 103-111, 1998
- Kronenberg, H.M. et al** The PTH/PTHrP receptor: one receptor for two ligands; Thakker RV(ed) Molecular Genetics of Endocrine Disorders, Chapman&Hall, London, 389-420, 1997
- Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; Nature 227, 680-685, 1970
- Lagna, G. et al** Partnership between DPC-4 and SMAD proteins in TGF- $\beta$  signalling pathways; Nature 383, 832-836, 1996
- Lauber, J.** Genetische Charakterisierung der östrogenabhängigen Entwicklung von Knochenmarkstromazellen der Ratte in vitro; Dissertation, 1998, TU Braunschweig
- Lee, S.J.** Identification of a novel member (GDF-1) of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily; Mol. Endocrinol. 4, 1034-1040, 1990
- Lehmann, L.M. et al** Peroxisome proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs; J. Biol. Chem. 272, 3406-3410, 1997
- Letsov, A. et al** Dpp signaling in *Drosophila* is mediated by the punt gene product: a dual ligand binding type II receptor of the TGF- $\beta$  receptor family; Cell 80, 899-908, 1995
- Lin, H.Y. et al** Expression cloning of the TGF $\beta$  type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase receptor; Cell 68, 775-785, 1992
- Lin, L.F.H. et al** GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons; Science 260, 1130-1132, 1993
- Lipman, M.L. et al** Cloning of human Pex cDNA; J. Biol. Chem. 173, 13729-13737, 1998
- Liu, F. et al** Human Type II receptor for Bone Morphogenetic Proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs; Mol. Cell. Biol. 15, 3479-3486, 1995
- Liu, F. et al** A human Mad protein acting as a BMP-regulated transcriptional activator; Nature 381, 620-623, 1996
- Luna de la, S.** Efficient transformation of mammalian cells with constructs containing a puromycin-resistance marker; Gene 62, 121-126, 1988
- Luo, G. et al** BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning; Genes & Development 9, 2808-2820, 1995
- Lyons, K.L. et al** Vgr-1, a mammalian gene related to *Xenopus* Vg-1, is a member of the transforming growth factor beta gene superfamily; PNAS 86, 4554-4558, 1989
- Lyons, K.M. et al** Patterns of expression of murine Vgr-1 and BMP-2A RNA suggest that transforming growth factor- $\beta$ -like genes coordinately regulate aspects of embryonic development; Genes&Development 3, 1657-1668, 1989b
- Lyons, K.M. et al** Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A); Development 109, 833-844, 1990
- Lyons, K.M. et al** The DVR gene family in embryonic development; Trends in Genetics 7, 408-412, 1991
- Maciá-Silva, M. et al** MADR2 is a substrate of the TGF- $\beta$  receptor and its phosphorylation is required for nuclear accumulation and signaling; Cell 87, 1215-1224, 1996
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.** Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

- Mark, M.P. et al** A comparative immunocytochemical study on the subcellular distribution of 44 kDa phosphoprotein and bone gamma-carboxyglutamic acid (gla)-containing protein in osteoblasts; *J. Bone and Mineral Res.* 2, 337-346, 1987
- Massagué, J.** The transforming growth factor-beta family; *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597-641, 1990
- Massagué, J.** Receptors for the TGF- $\beta$  family; *Cell* 69, 1067-1070, 1992
- Massagué, J.** TGF- $\beta$  signaling: Receptors, transducers, and Mad proteins; *Cell* 85, 947-950, 1996
- Mathews, L.S. et al** Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase; *Cell* 65, 973-982, 1991
- Mayer, P.** Über das Färben mit Hämatoxylin; *Mitt Zool Stat Neapel* 10, 170-186, 1891
- Mayne, R.** Arthritis and allied conditions: A textbook of rheumatology, Koopman, W.J., ed, Williams&Wilkins, Baltimore, MD, 207-227, 1996
- McPherron, A.C. et al** GDF-3 and GDF-9: Two new members of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily containing a novel pattern of cysteins; *J. Biol. Chem.* 268, 3444-3449, 1993
- Meersseman, G. et al** The C-terminal domain of Mad-like signal transducers is sufficient for biological activity in the *Xenopus* embryo and transcriptional activation; *Development* 61, 127-140, 1997
- Meno, C. et al** Left-right asymmetric expression of the TGF $\beta$ -family member lefty in mouse embryos; *Nature* 381, 151-155, 1996
- Messing, J. et al** A system for shotgun DNA sequencing; *Nucleic Acids Res.* 24, 309-321, 1981
- Mishina, Y. et al** Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis; *Genes&Development* 9, 3027-3037, 1995
- Miyazono, K.** Signal transduction by bone morphogenetic protein receptors: functional roles of smad proteins; *Bone* 25, 91-93, 1999
- Moses, H.L. et al** TGF-beta stimulation and inhibition of cell proliferation: New mechanistic insights; *Cell* 63, 245-247, 1990
- Moustaid, N. et al** Regulation of expression of the fatty acid synthase gene in 3T3-L1 cells by differentiation and triiodothyronine; *J. Biol. Chem.* 266, 18550-18554, 1991
- Mundlos, S. et al** Mutations involving the transcription factor Cbfa1 cause cleidocranial dysplasia; *Cell* 89, 773-779, 1997
- Nakata, K. et al** Osteoarthritis associated with mild chondrodysplasia in transgenic mice expressing alpha 1(IX) collagen chains with a central deletion; *PNAS* 90, 2870-2874, 1993
- Namiki, M. et al** A kinase domain-truncated type I receptor blocks bone morphogenetic protein-2-induced signal transduction in C2C12 myoblasts; *J. Biol. Chem.* 272, 22046-22052, 1997
- Nishimura, R. et al** Smad-5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12; *J. Biol. Chem.* 273, 1872-1879, 1998
- Nishitoh, H. et al** Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5; *J. Biol. Chem.* 271, 21345-21352, 1996
- Nohno, T. et al** Identification of a human type II receptor for Bone Morphogenetic Protein-4 that forms differential heteromeric complexes with Bone Morphogenetic Protein Type I Receptors; *J. Biol. Chem.* 270, 22522-22526, 1995

- Onichtchouk, D. et al** Silencing of TGF- $\beta$  signalling by the pseudoreceptor BAMBI; *Nature* 401, 480-485, 1999
- Otto, F. et al** Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development; *Cell* 89, 765-771, 1997
- Owen, T. et al** Progressive development of the Rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix; *J. Cell. Physiol.* 143, 420-430, 1990
- Ozkaynak, E. et al** Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily expressed early in embryogenesis; *J. Biol. Chem.* 267, 25220-25227, 1992
- Padgett, R.W. et al** Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo; *PNAS* 90, 2905-2909, 1993
- Padgett, R.W. et al** Smads are the central component in the transforming growth factor- $\beta$  signaling; *Pharmacol. Ther.* 78, 47-52, 1998
- Peters, K. et al** Unique expression pattern of the FGF receptor 3 gene during mouse organogenesis; *Dev. Biol.* 155, 423-430, 1993
- Prasher, D.C. et al** Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein; *Gene* 111, 229-233, 1992
- Quarles, L.D. et al** Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development; *J. Bone and Mineral Res.* 7, 683-692, 1992
- Rafferty, L.A. et al** Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in *Drosophila*; *Genetics* 139, 241-254, 1995
- Rafferty, L.A. et al** TGF- $\beta$  family signal transduction in *Drosophila* development: From Mad to Smads; *Dev. Biol.* 210, 251-268, 1999
- Reddi, A.H.** Bone Morphogenesis and Modeling: Soluble signals sculpt osteosomes in the solid state; *Cell* 89, 159-161, 1997
- Reznikoff, C.A. et al** Establishment and characterization of a cloned line of CH3 Mouse embryo cells sensitive to postconfluent inhibition of division; *Cancer Res.* 33, 3231-3238, 1973
- Roberts, A.B.; Sporn, M.B.** The Transforming Growth Factor  $\beta$ s; *Peptides, Growth Factors and their Receptors, Part I*, Springer-Verlag, Berlin, 419-472, 1990
- Robey, P.G.** The biochemistry of bone; *Endocrin. Metabol. Clin. North Amer.* 18, 859-902, 1989
- Rosen, V. et al** The BMP proteins in bone formation and repair; *Trends in Genetics* 8, 97-102, 1992
- Rosen, V. et al** Signaling pathways in skeletal formation: A Role for BMP Receptors; *Molecular and Developmental Biology of Cartilage* 785, 59-69, 1996
- Rosenzweig, B.L. et al** Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins; *PNAS* 92, 7632-7636, 1995
- Sakou, T.** Bone Morphogenetic Proteins: From basic studies to clinical approaches; *Bone* 22, 591-603, 1998
- Sampath, T.K. et al** *Drosophila* transforming growth factor- $\beta$  superfamily proteins induce endochondral bone formation in mammals; *PNAS* 90, 6004-6008, 1993
- Sandberg, M.M.; Vuorio, E.I.** Localization of types I, II, and III collagen mRNAs in developing human skeletal tissues by in situ hybridization; *J. Cell Biol.* 104, 1077-1084, 1987
- Sanger, F. et al** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *PNAS* 74, 5463-5467, 1977

- Scheufler, C. et al** Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7Å resolution; J.Mol.Biol. 287, 103-115, 1999
- Schipani, E. et al** A constitutively active mutant PTH-PTHrP receptor in Jansen-type metaphyseal chondrodysplasia; Science 268, 98-100, 1995
- Schipani, E. et al** Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice lacking that parathyroid hormone-related peptide; PNAS 94, 13689-13694, 1997
- Schüle, R. et al** Jun-Fos and receptors for vitamin A and D recognize a common response element in the human osteocalcin gene; Cell 61, 497-504, 1990
- Sekelsky, J.J. et al** Genetic characterization and cloning of Mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*; Genetics 139, 1347-1358, 1995
- Shibuya, H. et al** TAB1: an activator of TAK1 MAPKKK in TGF- $\beta$  signal transduction; Science 272, 1179-1182, 1996
- Shibuya, H. et al** Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development; EMBO J. 17, 1019-1028; 1998
- Souchelnytskyi, S. et al** Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C-terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for TGF- $\beta$  signaling; J. Biol. Chem. 272, 28107-28115, 1997
- Speck, N.A.; Terry, S.** A new transcription factor family associated with human leukemias; Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 5, 337-364, 1995
- Spiegelman, B.M. et al** Regulation of adipocyte gene expression in differentiation and syndromes of obesity/diabetes; J. Biol. Chem. 268, 6823-6826, 1993
- Stevens, D.A. et al** Hormone regulation of chondrocyte differentiation and endochondral bone formation; Molecular and Cellular Endocrinology 151, 195-204, 1999
- Stockwell, R.A.** The cell density of human articular and costal cartilage, J Anat 101, 753-763, 1967
- Storm, E.E. et al** Limb alterations in brachydism mice due to mutations in a new member of the TGF $\beta$ -superfamily; Nature 368, 639-643, 1994
- Strom, T. et al** Pex gene deletions in Gy and Hyp mice provide mouse models for X-linked hypophosphatemia; Hum.Mol.Genet. 6, 165-171, 1997
- Suzawa, M. et al** Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro; Endocrinology 140, 2125-2131, 1999
- Suzuki, A. et al** A truncated bone morphogenetic protein receptor affects dorsal-ventral patterning in the early *Xenopus* embryo; PNAS 91, 10255-10259, 1994
- Takuwa, Y. et al** Bone Morphogenetic Protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells MC3T3-E1; Biochem. Biophys. Res. Commun. 174, 96-101, 1991
- Taylor, S.M. et al** Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-Azacytidine; Cell 17, 771-779, 1979
- ten Dijke, P. et al** Activin receptor-like kinases: A novel subclass of cell-surface receptors with predicted serine/threonine kinase activity; Oncogene 8, 2879-2887, 1993
- ten Dijke, P. et al** Characterization of type I receptors for transforming growth factor- $\beta$  and activin; Science 264, 101-104, 1994a

- ten Dijke, P. et al** Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4; J. Biol. Chem. 269, 16985-16988, 1994b
- Termine, J.D. et al** Osteonectin, a bone specific protein linking mineral to collagen; Cell 26, 99-105, 1981
- Thies, R.S. et al** Recombinant human Bone Morphogenetic Protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-2017 stromal cells; Endocrinology 130, 1318-1324, 1992
- Tsuji, K. et al** Expression of PEBP2a/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppressed type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells; Bone 22, 87-92, 1998
- Tsukazaki, T. et al** SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF $\beta$  receptor; Cell 95, 779-791, 1998
- Tsumaki, N. et al** Role of CDMP-1 in Skeletal Morphogenesis: promotion of mesenchymal cell recruitment and chondrocyte differentiation; J. Cell Biol. 144, 161-173, 1999
- Ureña, P. et al** Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor messenger ribonucleic acids are widely distributed in Rat tissues; Endocrinology 133, 617-623, 1993
- Urist, M.R.** Bone: Formation by autoinduction; Science 150, 893-899, 1965
- Urist, M.R. et al** Bone cell differentiation and growth factors; Science 220, 680-686, 1983
- Vainio, S. et al** Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development; Cell 75, 45-58, 1993
- van der Rest, M. et al** Structure and function of collagen types; Mayne, R., and Burgeson, R.E., eds, Academic Press, Orlando, FL, 195-221, 1987
- Vivien, D. et al** Signaling activity of homologous and heterologous transforming growth factor- $\beta$  receptor kinase complexes; J. Biol. Chem. 270, 7134-7141, 1995
- Wang, E.A. et al** Bone Morphogenetic Protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T $\frac{1}{2}$  and 3T3 cells; Growth Factors 9, 57-71, 1993
- Wang, S. et al** Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis; Nature 369, 400-403, 1994
- Wang, Y. et al** A mouse model for achondroplasia produced by targeting fibroblast growth factor receptor 3; PNAS 96, 4455-4460, 1999
- Ward, W.W. et al** Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins; Photochem. Photobiol. 31, 611-615, 1980
- Weir, E.C. et al** Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation; PNAS 93, 10240-10245, 1996
- Weis-Garcia, F. et al** Complementation between kinase-defective and activation-defective TGF- $\beta$  receptors reveals a novel form of receptor cooperativity essential for signaling; EMBO J. 15, 276-289, 1996
- Wharton, K.A. et al** An activity gradient of decapentaplegic is necessary for the specification of dorsal patterns in the *Drosophila* embryo; Development 117, 807-822, 1993
- Whitman, M.** Smads and early developmental signaling by the TGF- $\beta$  superfamily; Genes & Development 12, 2445-2462, 1998
- Wieser, R. et al** GS domain mutations that constitutively activate TGF $\beta$ R-I, the downstream signaling component in the TGF- $\beta$  receptor complex; EMBO J. 14, 2199-2208, 1995

- Wigler, M. et al** Transfer of Herpes simplex thymidine kinase gene to cultured Mouse cells; Cell 11, 223-232, 1977
- Wolfman, N.M. et al** Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF- $\beta$  gene family; J. Clin. Invest. 100, 321-330, 1997
- Wozney, J.M. et al** Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities; Science 242, 1528-1534, 1988
- Wozney, J.M. et al** Bone Morphogenetic Protein and Bone Morphogenetic Protein gene family in bone formation and repair; Clinical Orthopaedics and Research 346, 26-37, 1998
- Wu, X. et al** Analysis of the native murine bone morphogenetic protein serine threonine kinase type I receptor (alk-3); J. Cell. Physiol. 168, 453-461, 1996
- Xiao, Z.S. et al** Intrinsic mineralization defect in Hyp mouse osteoblasts; Am. J. Physiol. 275, E700-E708, 1998
- Yamamoto, N. et al** Smad1 and Smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts; Biochem. Biophys. Res. Commun. 238, 574-580, 1997
- Yamashita, H. et al** Osteogenic Protein-1 binds to Activin Type II Receptors and induces certain Activin-like effects; J. Cell Biol. 130, 217-226, 1995
- Yamashita, H. et al** Bone Morphogenetic Protein Receptors; Bone 19, 569-574, 1996
- Yang, V.W. et al** Mechanism of regulation of the 422(aP2) gene by cAMP during preadipocyte differentiation; PNAS 86, 3629-3633, 1989
- Yazaki, Y. et al** Immunohistochemical localization of bone morphogenetic proteins and the receptors in epiphyseal growth plate; Anticancer Research 18, 2339-2344, 1998
- Yelick, P.C. et al** zALK-8, a novel type I serine/threonine kinase receptor, is expressed throughout early zebrafish development; Dev. Dyn. 211, 352-361, 1998
- Yi, S.E. et al** The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb; Development 127, 621-630, 2000
- Ying, S.Y.** Inhibins, activins and follistatins; J. Steroid Biochem. 33, 705-713, 1989
- Zhou, H. et al** Differential effects of transforming growth factor- $\beta$ 1 and bone morphogenetic protein-4 on gene expression and differentiated function of preosteoblasts; J. Cell. Phys. 155, 112-119, 1993
- Zou, H. et al** Distinct roles of type I bone morphogenetic protein receptors in the formation and differentiation of cartilage; Genes&Development 11, 2191-2203, 1997
- Zhou, X. et al** Nodal is a novel TGF $\beta$ -like gene expressed in the mouse node during gastrulation; Nature 361, 543-547, 1993

## 7 Anhang

### 7.1 Oligonukleotide

#### 7.1.1 Oligonukleotide zur Klonierung und Subklonierung

Name	Sequenz (5'→3')	Größe (Bp)	Anmerkung
<b>Alk-3 truncated 5' human</b>	ggaattcttacaattgaacaatgactcagctat	613	EcoRI Schnittstelle
<b>Alk-3 truncated 3' human</b>	gctcactgtcatcgtcatccttatagtcacgacgtctg cttgag	613	TGA, Flag-Tag
<b>Alk-3 truncated 5' Human 2</b>	ggaattcttacaattgaacaatgactcagctat	596	EcoRI Schnittstelle
<b>Alk-3 truncated 3' Human 2</b>	agttctagatcaacgacgtctgcttgagatg	596	TGA, XbaI Schnittstelle
<b>Alk-6 full length 5' murine</b>	gagagaattctattgataacatgctcttacgaa	1547	EcoRI Schnittstelle
<b>Alk-6 full length 3' murine</b>	gtcgacaagtatctgacgtcagagttaatgtcctg	1547	Sal-I Schnittstelle
<b>Alk-6 truncated 5' murine</b>	gagagaattctattgataacatgctcttacgaa	517	EcoRI Schnittstelle
<b>Alk-6 truncated 3' murine</b>	catcacttatcgtcatccttatagtcctgggtctt gtc	517	TGA, Flag-Tag
<b>CA-alk6 5'</b>	ggacaatagctaaggatattcagatgggaagcag	-	AS Position 203 Q>D
<b>CA-alk6 3'</b>	ctgcttcaccatctgaatatccttagctattgtcc	-	AS Position 203 Q>D
<b>GDF-5 5' human</b>	cctgcggatccagaggcacctt	1611	BamHI Schnittstelle
<b>GDF-5 3' human</b>	gatgtgccaccaggaagacagag	1611	

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma GIBCO BRL synthetisiert.

#### 7.1.2 Oligonukleotide zum Nachweis rekombinanter Expression

Name	Sequenz (5'→3')	Größe (Bp)	Vektor	Anmerkung
Rek-IA 5'	ttagtcttttgtcttttatttc	609	pMTRIPLE	T7-Promotor
Rek-IA 3'	tgtacaaaagcagctggagaaga	609	pMTRIPLE	BMPr-IA intern
rek-IA-DN 5'	ttagtcttttgtcttttatttc	609	pMTRIPLE	T7-Promotor
rek-IA-DN 3'	tgtacaaaagcagctggagaaga	609	pMTRIPLE	BMPr-IA intern
Alk-3DN-Flag 5'	agaaaaatcagaaaatggagtaa	708	pA3DNIGP	BMPr-IA intern
Alk-3DN-Flag 3'	tatacgacatcaccgggaaacagaa	708	pA3DNIGP	IRES
Rek-IB 5'	ttagtcttttgtcttttatttc	628	pMTRIPLE	T7-Promotor
Rek-IB 3'	gaggcctgatccactcc	628	pMTRIPLE	BMPr-IB intern
rek-IB-DN 5'	acactcccattcctcatcaaaga	351	pMTRIPLE	BMPr-IB intern
rek-IB-DN 3'	tggatcgaagctcaattaacacctac	351	pMTRIPLE	T3-Promotor
Alk-6DN-Flag 5'	acactcccattcctcatcaaaga	486	pA6DNIGP	BMPr-IB intern
Alk-6DN-Flag 3'	tatacgacatcaccgggaaacagaa	486	pA6DNIGP	IRES
rek-BMP-2 5'	aaaacgtcaagccaaacacaaca	826	pBIG-2	BMP-2 intern
rek-BMP-2 3'	attcaggggcccggaggattcttat	826	pBIG-2	IRES
Gal-Neo 5'	gatggattgcacgcagggtctc	681	pBIG-2 / pKIG	beta-Galaktosidase
Gal-Neo 3'	ctcttcagcaatatcacgggtagc	681	pBIG-2 / pKIG	Neomycin
rek-GDF-5 5'	ttagtcttttgtcttttatttc	405	pMTRIPLE	T7-Promotor
rek-GDF-5 3'	gggtcatccttctgggctgtgtc	405	pMTRIPLE	GDF-5 intern

In situ-Amplifikation 5'	ttcccagtcacgacgttgtaaaa	269	pGEM-T	„upstream“ der Klonierungsstelle
In situ-Amplifikation 3'	tatgcttccggctcgatgtgtg	269	pGEM-T	„downstream“ der Klonierungsstelle
IRES-Gal 5'	tactttgggtgtccgtgttcctt	518	pBIG-2 / pKIG	IRES
IRES-Gal 3'	taattcgcgtctggccttctgta	518	pBIG-2 / pKIG	beta-Galaktosidase
IRES-GFP 5'	tactttgggtgtccgtgttcctt	823	pA3DNIGP pA6DNIGP	IRES
IRES-GFP 3'	gtcacttatagatcatccatgccatgtg	823	pA3DNIGP pA6DNIGP	GFP intern
T7T3 5'	ttagctctttgtcttttatttc	158	pMTRIPLE	T7-Promotor
T7T3 3'	gategaagctcaattaacccctcac	158	PMTRIPLE	T3-Promotor

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma GIBCO BRL synthetisiert.

### 7.1.3 Oligonukleotide zum Nachweis spezifischer Markergene

Name	Sequenz (5' → 3')	Größe (Bp)	Temp.	Gen
ActR-I 5'	ctttccctccccgagtg	384	56.8	Activin Typ I Rezeptor
ActR-I 3'	caaggatgcaagctaaaagaca	384	56.8	Activin Typ I Rezeptor
ActR-II 5'	gttcgccgtctttctatctct	457	53.2	Activin Typ II Rezeptor
ActR-II 3'	cacccaaaatgcacaaatga	457	53.2	Activin Typ II Rezeptor
ActR-IIB 5'	gcgaggggaggtgagact	449/425	60.7	Activin Typ IIB Rezeptor
ActR-IIB 3'	catggccgtaggaggttcc	449/425	60.7	Activin Typ IIB Rezeptor
AdipoQ 5'	atgccgaagatgacgttactacaa	556	57.6	AdipoQ
AdipoQ 3'	gaggcctggccacattcttt	556	57.6	AdipoQ
AP-2 5'	gtgtgatgcctttgtgggaacct	380	56.2	adipocyte P2
AP-2 3'	agtcacgcctttcataacacattc	380	56.2	adipocyte P2
BMP-2 5'	gtttgtgtttggcttgacgc	720	50.0	BMP-2
BMP-2 3'	agacgtcctcagcgaatttg	720	50.0	BMP-2
BMP-4 5'	tgtgaggagtftccatcacg	566	50.0	BMP-4
BMP-4 3'	ttattcttctctggaccg	566	50.0	BMP-4
BMP-7 5'	ccaggagcggcgggagatgc	560	61.0	BMP-7
BMP-7 3'	agtgggtgctggtgctgtga	560	61.0	BMP-7
BMPR-IA 5'	ggacactgcccagatgatgctat	377	55.0	BMP Typ IA Rezeptor
BMPR-IA 3'	ttgtaacgaccctgcttgagat	377	55.0	BMP Typ IA Rezeptor
BMPR-IB 5'	ttgtaaatgccaccactgtcc	484	56.0	BMP Typ IB Rezeptor
BMPR-IB 3'	gaggcctgatccacttcc	484	56.0	BMP Typ IB Rezeptor
BMPR-II 5'	tatgggcgctctgctgtgca	502	57.0	BMP Typ II Rezeptor
BMPR-II 3'	ccctgtttccggctctctgtcaa	502	57.0	BMP Typ II Rezeptor
CBFA-1 5'	tgttcattcgctcacaacaacca	341	60.7	CBFA-1
CBFA-1 3'	caccaccgggctcacgtcgctcatct	341	60.7	CBFA-1
Col-Iα1 5'	gtccccctggctctgctggttct	536	62.7	Kollagen Typ Iα1
Col-Iα1 3'	ttccttgggggttcgggctgatgta	536	62.7	Kollagen Typ Iα1
Col-IIα1 5'	cctgtctgcttctgtaaaac	342	54.0	Kollagen Typ IIα1
Col-IIα1 3'	agcatctgtaggggtcttct	342	54.0	Kollagen Typ IIα1
Col-IX 5'	ctatgcgggggtatgatcagttagca	406	63.2	Kollagen Typ IXα1
Col-IX 3'	cacagatccctgggtacacctgagca	406	63.2	Kollagen Typ IXα1
FGF-Rez.3 5'	cctgcgcagtccecaaaagag	558	55.0	FGF-Rezeptor 3
FGF-Rez.3 3'	ctgcaggcatcaaggagtagt	558	55.0	FGF-Rezeptor 3
GDF-5 5'	ccggactgtaacccaaaaggac	426	60.7	GDF-5
GDF-5 3'	gcaacccgcccgtactg	426	60.7	GDF-5
HPRT 5'	gctggtgaaaaggacacctt	249	54.0	HPRT
HPRT 3'	cacaggactagaacacctgc	249	54.0	HPRT
Osteocalcin 5'	gcagacctagcagacacat	419	57.1	Osteocalcin



Osteocalcin 3'	gagctgctgtgacatccatac	419	57.1	Osteocalcin
Osteonectin 5'	ccctctgcgcacgcgtgact	488	59.7	Osteonectin
Osteonectin 3'	gggggtaatgggaggggtgac	488	59.7	Osteonectin
Osteopontin 5'	acatcagagccacgagtttcaca	423	53.1	Osteopontin
Osteopontin 3'	ttgcctgcctctacatacat	423	53.1	Osteopontin
Pex 5'	cttttggggaacagaataacc	574	52.6	Pex
Pex 3'	ctaccagagtcggcaggaatc	574	52.6	Pex
PTHr 5'	tcatcttcatggccttcttcagag	433	60.0	PTH/PTHrP Rezeptor
PTHr 3'	aatccctggaaggagttgaagagcat	433	60.0	PTH/PTHrP Rezeptor
Smad-1 5'	gctgttgacgctttggtgaa	531	59.0	Smad-1
Smad-1 3'	gctggttggggagtgaggtaggt	531	59.0	Smad-1
Smad-2 5'	tgfttgctgagtgcttaagtata	472	55.2	Smad-2
Smad-2 3'	aagtgcgtgttttgcctctgga	472	55.2	Smad-2
Smad-3 5'	cagtgctattttgcctcagctcc	836	58.7	Smad-3
Smad-3 3'	ccagctctaccctccggcgtgttc	836	58.7	Smad-3
Smad-4 5'	cttcgggaggagatcgcttttg	502	60.2	Smad-4
Smad-4 3'	cacgggggttcttgatgctct	502	60.2	Smad-4
Smad-5 5'	aacgctcctttcccttat	444	54.3	Smad-5
Smad-5 3'	atgccgcctagtgtttca	444	54.3	Smad-5
Smad-6 5'	gcccgtcgcgactgctgcttct	745	64.5	Smad-6
Smad-6 3'	ggtgctgccccggtgttagg	745	64.5	Smad-6
Smad-7 5'	tcgcgtggggaggctactgtgt	469	59.6	Smad-7
Smad-7 3'	ctaccggctgttgaagatgacctc	469	59.6	Smad-7

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma GIBCO BRL synthetisiert.

## 7.2 Sequenzen

### 7.2.1 cDNA-Sequenz des humanen BMPR-IA

```

GGATCCATTACAATTGAACAATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTTCTCGTGTTC AAGGAC 90
AGAATCTGGATAGTATGCTTCATGGCACTGGGATGAAATCAGACTCCGACCAGAAAAAGTCAGAAAAATGGAGTAACCTTAGCACCAGAGG 180
ATACCTTGCCTTTTTTAAAGTGCTATTGCTCAGGGCACTGTCCAGATGATGCTATTAATAACACATGCATAACTAATGGACATTGCTTTG 270
CCATCATAGAAGAAGATGACCAGGGAGAAACCATTAAGCTTCAGGGTGATGAAATATGAAGGATCTGATTTTCAGTGCAAGATTCTC 360
CAAAAGCCAGCTACGCCGACAAATAGAATGTTGTGCGACCAATTTATGTAACAGTATTTGCAACCCACACTGCCCCCTGTTGTGCTAG 450
GTCCGTTTTTTGATGGCAGCATTCGATGGCTGGTTTTGCTCATTTCTATGGCTGTCTGCATAATTGCTATGATCATCTTCTCCAGCTGCT 540
TTTGTTACAAACATTATTGCAAGAGCATCTCAAGCAGAGCTCGTTACAATCGTGATTTGGAACAGGATGAAGCATTTATCCAGTTGGAG 630
AATCACTAAAAGACCTTATTGACCACTCACAAGTTCTTGGTAGTGCGTCTGGACTACCTTTATTGGTTTCAGCGAACTATTGCCAAACAGA 720
TTCAGATGGTCCGGCAAGTTGGTAAAGGCCGATATGGAGAAGTATGGATGGGCAATGGCGTGCGCAAAAAGTGGCGGTGAAAGTATTCT 810
TTACCACTGAAGAAGCCAGCTGGTTTCGAGAAACAGAAATCTACCAAACTGTGCTAATGCGCCATGAAAACATACTTGGTTTCATAGCGG 900
CAGACATTAAAGGTACAGGTTCCCTGGACTCAGCTCTATTGATTACTGATTACCATGAAAATGGATCTCTCTATGACTTCCCTGAAATGTG 990
CTACACTGGACACCAGAGCCCTGCTTAAATTGGCTTATTCAGCTGCCTGTGGTCTGTGCCACCTGCACACAGAAATTTATGGCACCCAAG 1080
GAAAGCCCGCAATTGCTCATCGAGACCTAAAGAGCAAAAACATCTCATCAAGAAAAATGGGAGTTGCTGCATTGCTGACCTGGGCCCTTG 1170
CTGTTAAATTCAACAGTGACACAAATGAAGTTGATGTGCCCTTGAATACCAGGGTGGGCACCAACGCTACATGGCTCCCGAAGTGCTGG 1260
ACGAAAGCCTGAACAAAAACCACTTCCAGCCCTACATCATGGCTGACATCTACAGCTTCGGCCTAATCATTTGGGAGATGGCTCGTCTGTT 1350
GTATCAGAGGAGGATCGTGGAAGAATACCAATTGCCATATTACAACATGGTACCGAGTGATCCGTCATACGAAGATATGCGTGAGGTTG 1440
TGTGTGTCAAACGTTTGGCGCAATTGTGTCTAATCGGTGGAACAGTGATGAATGTCTACGAGCATTTTGAAGCTAATGTCTCAGAATGCT 1530
GGGCCACAAATCCAGCTCCAGACTCAGCATTGAGAATTAAGAAGACGCTTGCCAAGATGGTTGAATCCCAAGATGTAATAATCTGAT 1620
GGTTAAACCATCGGAGGAGAACTTCTAGA 1650

```

### 7.2.2 cDNA-Sequenz des humanen BMPR-IADN

```

GGAATTCCTTACAATTGAACAATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTTCTCGTGTTC AAGGAC 90
AGAATCTGGATAGTATGCTTCATGGCACTGGGATGAAATCAGACTCCGACCAGAAAAAGTCAGAAAAATGGAGTAACCTTAGCACCAGAGG 180
ATACCTTGCCTTTTTTAAAGTGCTATTGCTCAGGGCACTGTCCAGATGATGCTATTAATAACACATGCATAACTAATGGACATTGCTTTG 270
CCATCATAGAAGAAGATGACCAGGGAGAAACCATTAAGCTTCAGGGTGATGAAATATGAAGGATCTGATTTTCAGTGCAAGATTCTC 360
CAAAAGCCAGCTACGCCGACAAATAGAATGTTGTGCGACCAATTTATGTAACAGTATTTGCAACCCACACTGCCCCCTGTTGTGCTAG 450
GTCCGTTTTTTGATGGCAGCATTCGATGGCTGGTTTTGCTCATTTCTATGGCTGTCTGCATAATTGCTATGATCATCTTCTCCAGCTGCT 540
TTTGTTACAAACATTATTGCAAGAGCATCTCAAGCAGAGCTCGTTGATCTAGAAGT 596

```

### 7.2.3 cDNA-Sequenz des humanen BMPR-IA-DN-flg

GGAATTCCTTACAATTGAACAATGACTCAGCTATACATTTACATCAGATTATTGGGAGCCTATTTGTTTCATCATTTCTCGTGTTCAAGGAC 90  
AGAATCTGGATAGTATGCTTTCATGGGACTGGGATGAAATCAGACTCCGACCAGAAAAAGTCAGAAAAATGGAGTAACCTTAGCACCAGAGG 180  
ATACCTTGCCCTTTTTAAAGTGCTATTGCTCAGGGCACTGTCCAGATGATGCTATTAATAACACATGCATAACTAATGGACATTGCTTTG 270  
CCATCATAGAAGAAGATGACCAAGGAGAAACCACATTAGCTTTCAGGGTGATGAAATATGAAGGATCTGATTTTCAGTGCAAGATTCTC 360  
CAAAAGCCAGCTACGCCGACAATAGAATGTTGTCGGACCAATTTATGTAACCAAGTATTTGCAACCCCACTGCCCCCTGTTGTCATAG 450  
GTCCGTTTTTTGATGGCAGCATTCGATGGCTGGTTTTGCTCATTTCTATGGCTGTCTGCATAATTGCTATGATCATCTTCTCCAGCTGCT 540  
TTTGTACAAACATTATTGCAAGAGCATCTCAAGCAGACGCTCGTGACTATAAGGATGACGATGACAAGTGAGC 613

### 7.2.4 cDNA-Sequenz des murinen BMPR-IB

GAATTCATTGATAACATGCTCTTACGAAGCTCTGGAAAAATTAATGTGGGCACCAAGAAGGAGGATGGAGAGAGTACAGCCCCACCCC 90  
TCGGCCCAAGATCCTACGTTGTAATGCCACCACCCTGTCCGGAAGACTCAGTCAACAATATCTGCAGCACAGATGGGTACTGCTTCAC 180  
GATGATAGAAGAAGATGACTCTGGAATGCCTGTTGTCACTCTGGATGTCTAGGACTAGAAGGGTCAGATTTTCAATGTCGTGACACTCC 270  
CATTCTCATCAAGAAGATCAATTGAATGCTGCACAGAAAGGAATGAGTGTAATAAAGACCTCCACCCCACTCTGCCTCCTCTCAAGGA 360  
CAGAGATTTTGTGATGGGCCCATACACCACAAGGCCCTTGCTTATCTCTGTGACTGTCTGTAGTTTACTCTTGGTCTCTATTATTTTATT 450  
CTGTACTTCTCAGGTATAAAAGACAAGAAGCCCGACCTCGGTACAGCATTTGGGCTGGAGCAGGACGAGACATACATTCCTCTGGAGAGTC 540  
CCTGAGAGACTTGATCGAGCACTCTCAGAGCTCGGGGAGTGGAATCAGGCTCCCTCTGCTGGTCCAAAGGACAATAGCTAAAGCAAAATCA 630  
GATGGTGAAGCAGATTGGAAGAAGGCCGCTATGGCGAGGTGTGGATGGGAAAGTGGCGTGGAGAAAAGGTGGCTGTGAAAGTGTCTTCAC 720  
CACGGAGGAAGCCAGCTGGTTCCGAGAGACTGAGATATATCAGACGGTCTGATGCGGCATGAGAATATTTCTGGGGTTTCTGCTGCAGA 810  
TATCAAAAGGAGCTGGGTCTCTGGACTCAGTTGTACCTCATCACAGACTATCATGAAAACGGCTCCCTTTTATGACTATCTGAAATCCACCAC 900  
CTTAGACGCAAAAGTCCATGCTGAAGCTAGCCTACTCTCTGTGACGGGCTATGCCATTTACACACGGAATCTTTAGCACTCAAGGCAA 990  
GCCAGCAATCGCCCATCGAGACTTGAAAAGTAAAAACATCCTGGTGAAGAAAAATGGAACCTTGTGCATAGCAGACCTGGGCTTGGCTGT 1080  
CAAGTTTCAATTAGTGACACAAATGAGGTTGACATCCCACCAACACCCGGGTGGCACCAGCGCTATATGCCCTCAGAAGTGTGGACGA 1170  
GAGCTTGAATAGAAACCATTTCCAGTCTACATTATGGCTGACATGATGACAGTTTGGACTCATCTCTGGGAGATTGCAAGGAGATGTGT 1260  
TTCTGGAGGTATAGTGAAGAATACCAGCTTCCCTATCAGGACCTGGTGCCAGTGACCTTCTTATGAGGACATGAGAGAAATGTGTG 1350  
CATGAAGAAGTTACGGGCTTCAATCCCAATCGATGGAGCAGTGATGAGTGCTCAGGACAGATGGGGAAGCTTATGACAGAGTGTGGGC 1440  
GCAGAATCTGCTCTCAGGCTGACGGCCCTGAGAGTTAAGAAAACCTTGCCAAAATGTCAGAGTCCCAGGACATTAACTCTGACGTCA 1530  
GATACTTGTGCGAC 1543

### 7.2.5 cDNA-Sequenz des murinen BMPR-IBDN

GAATTCACACATGCTCTTACGAAGCTCTGGAAAAATTAATGTGGGCACCAAGAAGGAGGATGGAGAGAGTACAGCCCCACCCCTCGGCC 90  
AAGATCCTACGTTGTAATGCCACCACCCTGTCCGGAAGACTCAGTCAACAATATCTGCAGCACAGATGGGTACTGCTTCACGATGATA 180  
GAAGAAGATGACTCTGGAATGCCTGTTGTACCTCTGGATGTCTAGGACTAGAAGGGTCAGATTTTCAATGTCGTGACACTCCCATTCT 270  
CATCAAGAAGATCAATTGAATGCTGCACAGAAAGGAATGAGTGTAATAAAGACCTCCACCCCACTCTGCCTCCTCTCAAGGACAGAGAT 360  
TTTGTGATGGGCCCATACACCACAAGGCCCTTGCTTATCTCTGTGACTGTCTGTAGTTTACTCTTGGTCTCTATTATTTTATTCTGTTAC 450  
TTCAGGTATAAAAGACAAGAAGCCCGATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCCTCTGAGGATCCGTCGACTTGCAACCG 528

### 7.2.6 cDNA-Sequenz des murinen BMPR-IB-DN-flg

GAATTCATTGATAACATGCTCTTACGAAGCTCTGGAAAAATTAATGTGGGCACCAAGAAGGAGGATGGAGAGAGTACAGCCCCACCCC 90  
TCGGCCCAAGATCCTACGTTGTAATGCCACCACCCTGTCCGGAAGACTCAGTCAACAATATCTGCAGCACAGATGGGTACTGCTTCAC 180  
GATGATAGAAGAAGATGACTCTGGAATGCCTGTTGTACCTCTGGATGTCTAGGACTAGAAGGGTCAGATTTTCAATGTCGTGACACTCC 270  
CATTCTCATCAAGAAGATCAATTGAATGCTGCACAGAAAGGAATGAGTGTAATAAAGACCTCCACCCCACTCTGCCTCCTCTCAAGGA 360  
CAGAGATTTTGTGATGGGCCCATACACCACAAGGCCCTTGCTTATCTCTGTGACTGTCTGTAGTTTACTCTTGGTCTCTATTATTTTATT 450  
CTGTTACTTTCAGGTATAAAAGACAAGAAGCCCGAGACTATAAGGATGATGACGATAAGTGATG 513

### 7.2.7 cDNA-Sequenz des humanen GDF-5

CCTGCGGATCCAGAGGACCTTTGCTGCTGCCGCTGTTCTCTTTGGTGTCTTTCAGCGGCTGGCCAGAGGATGAGACTCCCCAACTCTCT 90  
CACTTTCTTGTCTTTGGTACCTGGCTTTGGCTGGACCTGGAATTCATCTGCACTGTGTTGGGTGCCCTGACTTTGGGCCAGAGACCCGAGGG 180  
GACCAGGCCAGGATTGGCCAAAGCAGAGGCCAAGGAGAGGGCCCCCTGGCCCGAACGCTCTTCAGGCCAGGGGGTCACAGCTATGGTGG 270  
GGGGGCCACCAATGCCAATGCCAGGGCAAGAGGAGGCACGGGGCAGACAGGAGGCTTGACACAGCCCAAGAAGGATGAACCCAAAAAGCT 360  
GCCCCCAGACCGGGCGGCCCTGAACCAAGCCAGGACACCTCCCAAAACAGGCAGGCTACAGCCCGGACTGTGACCCCAAAAGGACA 450  
GCTTCCCAGGAGCAAGGCACCCCAAAAGCAGGATCTGTCCCAAGCTTCTTCTGCTGAAGAAGGCCAGGGAGCCCGGGCCCCACGAGA 540  
GCCCAAGGAGCGGTTTGGCCACCCCATCACACCCACGAGTACATGCTCTCGCTGTACAGGACGCTGTCCGATGTGACAGAAAGGG 630  
AGGCAACAGCAGCGTGAAGTTGGAGGCTGGCCTGGCCAACACCATCACCAGCTTTATTGACAAAGGGCAAGATGACCGAGGTCCCGTGGT 720  
CAGGAAGCAGAGGTACGTGTTTGACATTAGTGCCCTGGAGAAGGATGGGCTGCTGGGGGCCGAGCTGCGGATCTTGGGAAGAAGCCCTC 810  
GGACACGGCCAGGCAAGCGGCCCGGGAGGCGGGCGGGCTGCCAGCTGAAGCTGTCCAGCTGCCCAAGCGGGCGGCCAGCCGGCCCTT 900  
GCTGGATGTGCGCTCCGTGCCAGGCTGGACGGATCTGGCTGGGAGGTGTTTCGACATCTGGAAGCTCTTCCGAACTTTAAGAACTCGGC 990  
CCAGCTGTGCTGGAGCTGGAGGCTGGGAACGGGGCAGGGGCTGGACCTCCGTGGCTTGGCTTTCGACCGCGCCGCGCCGAGGTCCA 1080  
CGAGAAGGCCCTGTTCTGGTGTGTCGCGCACCAAGAAACAGGACCTGTTCTTAAATGAGATTAAAGGCCGCTCTGGCCAGGACGATAA 1170  
GACCGTGTATGAGTACCTGTTACGCGAGCGGCCAAAACGGCGGGCCCCACTGGCCACTCGCCAGGGCAAGCGACCCAGCAAGAACCTTAA 1260  
GGCTCGGTGACGTGCGAAGGCACTGCATGTCACTTCAAGGACATGGGCTGGGACGA<sub>9</sub>TGGATCATCGCACCCCT<sub>9</sub>GAGTACGAGGCTTT 1350  
CCACTGCGAGGGGCTGTGCGAGTTCCATTGCGCTCCCACT<sub>9</sub>TGGAGCCCAAGATCATGCAGTCATCCAGACCTGATGAACCTCATGGA 1440  
CCCCAGGCTCCACACCACTGCTGTGTGCCACGCGGCTGAGTCCCATCAGCATCCTCTTCTATTGACTCTGCCAACCAACGCTGGTGTA 1530  
TAAGCAGTATGAGGACATGGTCGTGGAGTCGTGTGGCTGCAGGTAGCAGCACTGGCCCTCTGTCTTCTGGTCGACACATC 1611

### 7.3 Plasmide und cDNAs

pSBC1-SEAP	Arbeitsgruppe Eukaryontengenetik, GBF-Braunschweig
pPGK $\beta$ geobpA	Arbeitsgruppe Eukaryontengenetik, GBF-Braunschweig
pBSpAC $\Delta$ p	S. Kirchhoff, Arbeitsgruppe Eukaryontengenetik, GBF-Braunschweig
pMTriple	J. Lauber, Genregulation und Differenzierung, GBF-Braunschweig
cDNA BMPR-IB	P. Tylzanowski, Cellgen, Leuven, Belgien
cDNA BMPR-IB-DN	P. Tylzanowski, Cellgen, Leuven, Belgien

### 7.4 Geräte und Materialien

#### 7.4.1 Geräte

Elektrotransformationsapparat:	Bio-Rad, Gene Pulser
Fluoreszenzdokumentation	Hamamatsu, digital camera C4742-95
Geldokumentation:	PHASE, GelCam; Appligene Imager
Mikroskope:	Leitz, Labovort FS; Zeiss, Axiovert 25; Olympus, AX70
PCR-Apparat:	Perkin Elmer, GeneAMP PCR System 2400
Photometer:	Spectronic, Genesys 2; Pharmacia, GeneQuant
Sequenzierapparat:	Pharmacia LKB-ALF DNA Sequencer
Sterilbank:	Heraeus Lamin Air
Zellkulturdokumentation:	INTAS; Pixera digital camera
Zellkulturinkubator:	Heraeus B 5061 EK/02

#### 7.4.2 Materialien und Zellkulturmedien

Reaktionsgefäße:	Sarstedt-Reaktionsgefäße
Zellkulturgefäße:	Nunc
FCS:	Biochrom, Berlin
DME:	Biochrom, Berlin

Die übrigen hier eingesetzten Materialien und Geräte gehören zur Standardlaborausstattung und zeigen keinen relevanten Einfluß auf die Ausführung und die resultierenden Ergebnisse der Versuche.

#### 7.4.3 Enzyme und Chemikalien

Die Restriktionsendonukleasen, Alkalische Phosphatase (Shrimp), T<sub>4</sub>-Polynukleotidkinase, Klenow-Fragment, M-MLV-Reverse Transkriptase und Taq-DNA-Polymerase wurden von den Firmen Biolabs, Boehringer, GIBCO BRL, Pharmacia, Promega und USB bezogen.

Es wurden Chemikalien der Firmen Bayer, Biolabs, Bio-Rad, Boehringer, Fluka, GIBCO BRL, Merck, Pharmacia, Renner, Riedel-de-Haen, Roth, Seromed, Serva und Sigma verwendet.

## 7.5 Computerprogramme/Datenbanken

Adobe Photoshop 5.0  
 Blast-Search  
 CorelDraw 6.0  
 DNASTAR 4.0  
 Embl-Database  
 Excel 7.0  
 HPD-CP version 2.1.3; Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH; Fluoreszenzdokumentation  
 Medline  
 MVPilot 1.0 Zellkulturdokumentation  
 Vector NTI  
 WinCam 1.0  
 Microsoft Office 97

## 7.6 Abkürzungen

<b>β-Gal</b>	β-Galactosidase	<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>χ-S-ATP</b>	Adenosin-χ-thiotriphosphat	<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>μF</b>	Microfarad	<b>DNase</b>	Desoxyribonuklease
<b>μg</b>	Microgramm	<b>dNTP</b>	Desoxynukleotidtriphosphat
<b>μl</b>	Microliter	<b>Dpn I</b>	Restriktionsendonuklease
<b>μm</b>	Micrometer	<b>ds</b>	doppelsträngig
<b>μM</b>	Micromolar	<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b>A</b>	Adenosin	<b>dTTP</b>	Desoxythymidintriphosphat
<b>ALP</b>	Alkalische Phosphatase	<b>EcoRI</b>	Restriktionsendonuklease
<b>amp</b>	Ampicillinresistenz	<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>APS</b>	Ammoniumperoxydisulfat	<b>EtOH</b>	Ethanol
<b>AS</b>	Aminosäuren	<b>fl</b>	fl-Replikationsursprung
<b>ATP</b>	Adenosintri-phosphat	<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>BamHI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>g</b>	Gramm
<b>Bp</b>	Basenpaare	<b>G</b>	Guanosin
<b>BCP</b>	Brom-Chlor-Propan	<b>Gly</b>	Glycin
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin	<b>h</b>	Stunde
<b>C</b>	Cytidin	<b>Hepes</b>	N-2-Hydroxyethylen-
<b>c</b>	Konzentration		piperazin-N-ethansulfonsäure
<b>CA</b>	konstitutiv-aktiv	<b>HindIII</b>	Restriktionsendonuklease
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA	<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-
<b>colE1</b>	colE1-Replikationsursprung		Phosphoribosyl-Transferase
<b>D</b>	Asparaginsäure	<b>IRES</b>	internal ribosome entry site
<b>dATP</b>	Desoxyadenosintri-phosphat	<b>Kb</b>	Kilobasen
<b>dCTP</b>	Desoxycytidintri-phosphat	<b>konz</b>	konzentriert
<b>ddATP</b>	Didesoxyadenosintri-phosphat	<b>KpnI</b>	Restriktionsendonuklease
<b>ddCTP</b>	Didesoxycytidintri-phosphat	<b>kV</b>	Kilovolt
<b>ddGTP</b>	Didesoxyguanosintri-phosphat	<b>l</b>	Liter
<b>ddTTP</b>	Didesoxythymidintri-phosphat	<b>LMP</b>	Low Melting Point
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat	<b>M</b>	Molar
<b>dGTP</b>	Desoxyguanosintri-phosphat	<b>mA</b>	Milliampère
<b>DN</b>	dominant-negativ	<b>MCS</b>	multiple cloning site
<b>DMF</b>	N, N-Dimethylformamid	<b>mg</b>	Milligramm

<b>min</b>	Minute	<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkription-PCR
<b>mio</b>	Millionen	<b>Sall</b>	Restriktionsendonuklease
<b>ml</b>	Milliliter	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>mM</b>	Millimolar	<b>sek</b>	Sekunde
<b>mRNA</b>	messenger RNA	<b>Ser</b>	Serin
<b>MscI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>SmaI</b>	Restriktionsendonuklease
<b>N</b>	Normale	<b>ss</b>	einzelsträngig
<b>NaAc</b>	Natriumacetat	<b>T</b>	Thymidin
<b>NcoI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>T3</b>	T3-Promotor
<b>Neo</b>	Neomycin-Resistenzgen	<b>T7</b>	T7-Promotor
<b>ng</b>	Nanogramm	<b>TA</b>	Tris-Acetat
<b>NH<sub>4</sub>Ac</b>	Ammoniumacetat	<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>NheI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>TBS</b>	Tris buffered saline
<b>nm</b>	Nanometer	<b>TCA</b>	Trichloracetat
<b>nmol</b>	Nanomol	<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>NotI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetramethyl- ethyldiamin
<b>OD</b>	Optische Dichte	<b>Temp</b>	Temperatur
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion	<b>tRNA</b>	transfer RNA
<b>PhaKo</b>	Phasenkontrast	<b>Tyr</b>	Tyrosin
<b>pmol</b>	Picomol	<b>U</b>	Unit
<b>polyA</b>	Polyadenylierungssignal	<b>Upm</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>PPase</b>	Pyrophosphatase	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>PstI</b>	Restriktionsendonuklease	<b>Vol</b>	Volumen
<b>Q</b>	Glutamin	<b>v/v</b>	volume per volume
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure	<b>w/v</b>	weight per volume
<b>RNase</b>	Ribonuklease	<b>XBaI</b>	Restriktionsendonuklease
<b>rpm</b>	rounds per minute	<b>XhoI</b>	Restriktionsendonuklease
<b>RT</b>	Raumtemperatur		

